

Assoziation von Herpes Simplex Virus Typ 1 Glykoprotein B und MHC Klasse II-Molekülen

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Elisabeth Sievers
aus
Bonn

Bonn (Mai) 2002

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. N. Koch
2. Referent: Prof. K.-H. Scheidtmann

Tag der Promotion:

Abkürzungen.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 Antigenprozessierung und –präsentation.....	2
1.1.2 Die MHC Klasse II-assoziierte Invariante Kette.....	4
1.1.3 Funktion der Invarianten Kette bei der Antigenpräsentation.....	6
1.2 Immunität gegenüber Viren.....	8
1.2.1 Virale Strategien zur Verhinderung einer Immunantwort.....	11
1.3 HSV und das Immunsystem.....	14
1.3.1 HSV-1 Glykoprotein B (gB).....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	22
2. Material und Methoden.....	24
2.1 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.1.2 Präparation viraler DNA.....	24
2.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	25
2.1.4 Modifikation von DNA-Fragmenten.....	25
2.1.5 Klonierung von Oligonukleotiden.....	26
2.1.6 PCR und Mutagenese.....	28
2.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....	31
2.1.8 Sequenzanalyse.....	33
2.2 Zellbiologische Methoden.....	33
2.2.1 Transiente Expression rekombinanter Gene in COS7-Zellen.....	34
2.2.2 Proliferationstest.....	34
2.3 Biochemische Methoden.....	35
2.3.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine.....	35
2.3.2 Immunpräzipitation.....	35
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.3.4 Behandlung immunpräzipitierter Glykoproteine mit Endoglykosidase H.....	37
2.3.5 Tunicamycin Behandlung von transfizierten COS7-Zellen.....	37
2.3.6 Durchflusscytometrie.....	38

2.3.7	Oberflächenbiotinylierung von transfizierten COS7-Zellen.....	39
2.4	Verwendete Computer Software und Datenbanken.....	40
3.	Ergebnisse.....	41
3.1	HSV-1 Glykoprotein B (gB) enthält eine Sequenz mit Homologie zur MHC Klasse II-Bindungsstelle der Invarianten Kette (Ii).....	41
3.2	Bindung von HSV-1 gB an verschiedene MHC II-Allotypen.....	42
3.3	Identifizierung der für die Assoziation wichtigen Aminosäuren innerhalb der promiskuitiven Bindungsstelle (PBS) der Ii.....	43
3.4	Beschreibung der chimären Ii/gB-Konstruktionen.....	47
3.5	Assoziation zwischen chimären Ii/gB-Konstrukten und DR-Molekülen.....	49
3.6	HSV-Peptid-Bindungen an Oberflächen-DR Moleküle auf humanen B-Zelllymphomen.....	52
3.7	Bindung <i>in vivo</i> generierter gB-Peptide an DR-Moleküle.....	54
3.8	Einfluss von DR-Molekülen auf die Halbwertszeit von gB.....	55
3.9	Transport von gB aus dem ER in den Golgi-Komplex.....	58
3.10	Nachweis von gB- und DR-Molekülen an der Oberfläche transfizierter COS7-Zellen.....	59
3.11	Sequenzvergleich von gB in verschiedenen HSV-1 Stämmen.....	61
3.12	Assoziation zwischen gBs verschiedener HSV-1 Stämme und DR-Molekülen....	62
3.13	Bindung von gB KOS und gB ANGpath an Maus Klasse II-Moleküle.....	64
3.14	Assoziation zwischen chimären Ii/gB-Konstrukten und IA ^k -Molekülen.....	65
3.15	Konstruktion von gB ANGpath Δ 75-92 und gB ANGpath _{NT}	67
3.16	Assoziation von gB ANGpath Δ 75-92 und gB ANGpath _{NT} mit IA ^k - und DR-Molekülen.....	69
3.17	Ii und gB ANGpath binden nach Kotransfektion an IA ^k -Moleküle.....	71
3.18	Einfluss von gB auf die HEL-Antigenpräsentation in COS7-Zellen.....	74
4.	Diskussion.....	76
4.1	Assoziation zwischen gB und Klasse II-Molekülen verschiedenen Allotyps und unterschiedlicher Spezies.....	77
4.2	Bindungseigenschaften von gB ₇₅₋₉₅	78
4.3	Transport von gB in Assoziation mit Klasse II-Molekülen.....	79
4.4	gB kann die Ii in der Antigenpräsentation nicht ersetzen.....	80

4.5	gBs verschiedener HSV-1 Stämme assoziieren mit humanen und Maus Klasse II-Molekülen.....	81
5.	Zusammenfassung.....	84
6.	Literaturverzeichnis.....	85
7.	Anhang	

Abkürzungen

aa	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
bp (kb)	Basenpaare (Kilobasen)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBS	class II-binding site
cDNA	komplementäre DNA
Ci (μCi)	Curie (Mikrocurie)
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DCs	Dendritische Zellen
ddw	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTPs	Desoxynukleotidgemisch
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiotreitol
DYT	Bakterien-Kulturmedium (Double-Yeast-Tryptone)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EBV	Epstein Barr Virus
F (μF)	Farad (Mikrofarad)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g (mg, μg, ng)	Gramm (Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm)
gB	Glykoprotein B
h	Stunde(n)

HCMV	Humanes Zytomegalievirus
HEL	Hühnereilysozym (Hen Egg Lysozyme)
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]-Piperazin-N'[Ethansulfonsäure])
HHV	Humanes Herpes Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen (Human Leucocyte Antigen)
HRP	Horseradish Peroxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
HWZ	Halbwertszeit
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ii	Invariante Kette
IL	Interleukin
l (ml, µl)	Liter (Milliliter, Mikroliter)
m (mm, nm)	Meter (Millimeter, Nanometer)
M (mM, µM, nM)	molar (millimolar, mikromolar, nanomolar)
mAb	monoklonaler Antikörper
MAT	Matrixprotein des Influenzavirus
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (major histocompatibility complex)
MIIC	MHC Klasse II-Kompartiment
min	Minute(n)
MOMP	Hauptprotein der äußeren Membran von <i>Chlamydia trachomatis</i>
mw	Molekulargewicht
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet P 40
ODx	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid

PPO	2.5-Diphenyloxazol
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RT	Raumtemperatur
s	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SV 40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAP	Peptidtransporter (transporters associated with antigen presentation)
TBS	Tris-gepufferte Saline
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris/EDTA-Lösung
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminoethan
U (mU)	Einheit (Unit, Milliunit)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
V (kV)	Volt (Kilovolt)
Vol.	Volumen
VZV	Varizella Zoster Virus
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Mit Hilfe des Immunsystems ist der Körper in der Lage, sich vor Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen (z.B. Bakterien und Viren) zu schützen. Sobald eine Störung des Immunsystems vorliegt und die Unterscheidung von „selbst“ und „fremd“ nicht mehr möglich ist, können sich pathogene Erreger im Körper ausbreiten. Viele Mikroorganismen haben jedoch auch Strategien entwickelt, um der Erkennung durch ein intaktes Immunsystem zu entgehen. Dabei nutzen sie verschiedenste Fluchtmechanismen, da auch das Immunsystem über eine Vielzahl von Abwehrmechanismen verfügt.

Das Immunsystem der Vertebraten ist ein großes Verbundsystem aus Zellen, Geweben und Molekülen. Hierbei unterscheidet man zwei Arten von Abwehrsystemen: Die angeborene, unspezifische Immunität und die spezifische, adaptive Immunität. Zu den unspezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems gehören neben den physiologischen und anatomischen Barrieren, phagozytierende Zellen (Makrophagen, Monocyten) und die von ihnen sezernierten Zytokine, natürliche Killerzellen und Eosinophile, sowie verschiedene Blutbestandteile wie das Komplementsystem. Die angeborene Immunität dient der ersten Abwehr von Krankheitserregern, bietet jedoch keinen spezifischen Schutz vor erneuter Infektion. Im Gegensatz dazu verfügt die adaptive Immunität über spezifische Abwehrmechanismen wie Lymphozyten mit spezifischen Rezeptoren für Antigene (Fremdmoleküle). Während einer adaptiven Immunabwehr entstehen ausdifferenzierte Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere und wirksamere Reaktion ermöglichen. Die spezifische Immunantwort verstärkt die Schutzmechanismen der unspezifischen Immunität und ist für einen Langzeitschutz durch Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich.

Die Lymphozyten (B- und T-Zellen) der spezifischen Immunabwehr sind auf die Erkennung von extra- und intrazellulären Krankheitserregern spezialisiert. Die von B-Zellen gebildeten Antikörper sind gegen Erreger und deren Toxine im extrazellulären Raum gerichtet. Für eine zelluläre Immunantwort sind die T-Zellen verantwortlich, die mit Hilfe ihrer Rezeptoren präsentierte Peptidfragmente intrazellulärer Erreger (z.B. Viren) erkennen können und infizierte Zielzellen direkt oder indirekt über die Aktivierung von B-

Zellen und Makrophagen vernichten können. Somit unterstützen T-Zellen auch die Immunantwort durch B-Zellen.

Die spezifische Immunität entwickelt sich mit der klonalen Selektion von Lymphozyten. Jeder im Körper vorhandene Lymphozyt trägt einen Antigen-spezifischen Rezeptor an seiner Zelloberfläche. Die Wechselwirkung eines Antigens mit dem Rezeptor und ein kostimulatorisches Signal führen zur Aktivierung des Antigen-spezifischen Lymphozyten. Aktivierte Lymphozyten proliferieren und differenzieren dann zu Effektorzellen und Gedächtniszellen. Die Differenzierung der B-Zellen führt zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. T-Zellen differenzieren zu zwei Arten von Effektorzellen: Cytotoxische T-Zellen töten infizierte Zellen direkt. T-Helferzellen aktivieren B-Zellen und Makrophagen und sind somit indirekt an der Vernichtung von Krankheitserregern beteiligt. Kostimulatorische Signale, die zur Aktivierung der Lymphozyten und Makrophagen notwendig sind, können Membranproteine oder Zytokine sein. Zytokine sind als Botenstoffe des Immunsystems für die Regulation des Zusammenspiels aller an einer Immunantwort beteiligten Mechanismen verantwortlich.

1.1.1 Antigenprozessierung und –präsentation

Im Gegensatz zu B-Zellen, die mit Hilfe ihres Antigen-spezifischen Rezeptors komplettes, lösliches Antigen binden können, erkennen T-Zellen Antigene nur in Form von Peptidfragmenten. Für eine Aktivierung der T-Zellen müssen die antigenen Peptide auf der Zelloberfläche von infizierten Zellen präsentiert werden. Hierzu binden Peptidrezeptoren intrazellulär die bei der Antigenprozessierung entstehenden antigenen Peptide und transportieren sie zur Zelloberfläche, wo der Komplex aus Fremdpeptid und präsentierendem Selbstprotein dann durch den spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt werden kann. Die präsentierenden Peptidrezeptoren werden als MHC Moleküle bezeichnet, da sie im Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) codiert sind. Die MHC Moleküle sind heterodimere Glykoproteine, die über einen Transmembranbereich in der Zellmembran verankert sind. Ihre Untereinheiten sind nicht-kovalent miteinander verbunden. Membran-distale Domänen dieser Untereinheiten bilden eine Peptid-bindende Grube (Cresswell 1994). Durch den enormen Polymorphismus innerhalb der Peptid-bindenden Domäne kann von den verschiedenen MHC Allotypen insgesamt eine große Anzahl immunogener Peptide präsentiert werden.

Man unterscheidet zwei Klassen von MHC Molekülen: MHC Klasse I- und MHC Klasse II-Moleküle. MHC Klasse I-Moleküle binden überwiegend Peptide, die aus dem Abbau von Proteinen im Cytosol stammen, und präsentieren diese endogenen Peptide den $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen (Zinkernagel und Doherty, 1974; Yewdell und Bennink, 1990). Typischerweise stammen fremde endogene Peptide von viralen Proteinen, die im Cytoplasma infizierter Zellen synthetisiert werden. Ihr proteolytischer Abbau erfolgt über einen Proteasom-Komplex im Cytosol (Brown et al., 1991a; Harding et al., 1995). Die daraus resultierenden Peptide gelangen anschließend über spezifische TAP-Transporterproteine (transporters associated with antigen processing) ins Endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie dann in die Peptidbindungsgrube von MHC Klasse I-Molekülen binden (Yewdell und Bennink, 1990; Neefjes et al. 1993; Shepherd et al. 1993). An der Faltung und Peptidbeladung von MHC Klasse I-Molekülen sind die ER-ständigen Chaperone Calnexin, Calreticulin und Tapasin beteiligt (Williams DB und Watts TH, 1995; Ortman B et al. 1997). Mit Peptid beladene MHC Klasse I-Moleküle verlassen das ER, durchlaufen dann den Golgi-Komplex und gelangen entlang des sekretorischen Transportweges zur Zelloberfläche (Ploegh et al. 1981; Germain und Margulies, 1993), wo der Peptid/MHC I-Komplex von $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen erkannt werden kann.

MHC Klasse II-Moleküle binden Peptide von extrazellulären Proteinen. Die Proteine werden durch Rezeptor-vermittelte Endocytose, Phagocytose oder durch Pinocytose von Zellen aufgenommen (Unanue und Allen, 1987; Yewdell und Bennink, 1990) und gelangen anschließend in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente der Zelle, wo sie mittels saurer Proteasen zu Peptiden abgebaut werden. Die Peptide können hier an MHC Klasse II-Moleküle binden, die über die Assoziation mit der Invarianten Kette (Ii) in die endosomalen Kompartimente gelangen. Nach Degradation der Ii wird die Peptid-Bindungsgrube der Klasse II-Moleküle frei für die Bindung der exogenen Peptide. Der Peptid/MHC Klasse II-Komplex gelangt anschließend zur Zelloberfläche, wo er von $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt werden kann. Man findet auf MHC II-Molekülen auch Peptide zellulärer Proteine, die durch die endosomale/lysosomale Prozessierung von Membranproteinen entstehen (Rudensky et al. 1991; Chiczy et al. 1993). Vereinzelt werden auf Klasse II-Molekülen auch Peptide von Cytosol-ständigen Proteinen präsentiert, deren Prozessierungsweg sich jedoch von dem der MHC Klasse I-Moleküle unterscheidet (Mukherjee P. et al. 2001).

Die Expression der MHC Moleküle ist gewebespezifisch. Während MHC Klasse I-Moleküle auf vielen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden, ist die Expression der MHC Klasse II-Moleküle hauptsächlich auf die professionellen Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Zellen beschränkt. Bei vielen Zelltypen kann jedoch die Expression von MHC Molekülen durch Stimulation mit IFN- γ oder anderen Zytokinen induziert bzw. verstärkt werden.

1.1.2 Die MHC Klasse II-assoziierte Invariante Kette

Ende der Siebziger Jahre wurde erstmals die Assoziation von MHC II-Molekülen mit einem nicht polymorphen Protein beschrieben, das man auch als Invariante Kette (Ii) bezeichnet (Jones et al., 1979). Obwohl die Ii nicht im MHC codiert ist (Koch et al., 1982), wird sie in APCs mit MHC Klasse II-Molekülen koexprimiert, was auf gemeinsame regulatorische Sequenzen in der Promotorregion der MHC Klasse II- und Ii-Gene zurückzuführen ist (Pessara und Koch, 1990; Zhu und Jones, 1990; Brown et al., 1991b). Neben der konstitutiven Expression in den immunkompetenten APCs kann die Expression der Ii -wie auch die der MHC II-Moleküle- durch Zytokine wie IFN- γ oder TNF- α induziert werden (Koch et al., 1984; Paulnock-King et al., 1985; Momburg et al., 1986; Pessara et al., 1988).

Die Ii ist im Gegensatz zu den MHC Proteinen ein Typ II-Membranprotein (Strubin et al., 1984; Lipp und Dobberstein, 1986). Sie wird in zwei verschiedenen Formen exprimiert (Ii31 und Ii41), die durch alternatives Spleißen eines zusätzlichen Exons entstehen (Strubin et al., 1986; Koch et al., 1987). Die überwiegend exprimierte Form (Ii31) der menschlichen Ii ist 216, die der Maus 215 Aminosäuren (aa) lang (Claesson et al., 1983; Singer et al., 1984). Während des Transportes durch die Zelle wird die Ii posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen umfassen unter anderem N-Glykosylierungen (Machamer und Cresswell, 1982; Koch et al 1987; O'Sullivan et al. 1987), O-Glykosylierungen (Machamer und Cresswell, 1982; Claesson und Peterson, 1983), Phosphorylierungen (Spiro und Quaranta, 1989) und Fettacylierungen (Koch und Hämmerling, 1985; Simonis und Cullen, 1986).

Die Assoziation der Ii mit MHC Klasse II-Molekülen findet unmittelbar nach deren Einlagerung in die ER-Membran statt (Sung und Jones, 1981; Kvist et al., 1982). Neu synthetisierte Ii-Moleküle bilden Trimere und assoziieren mit Calnexin, einem ER-Chaperon (Anderson und Cresswell, 1994; Romagnoli und Germain, 1995). An das Ii-

Trimer lagern sich sequentiell drei MHC Klasse II $\alpha\beta$ -Heterodimere an, wodurch das Calnexin verdrängt wird. Erst nach vollständiger Assoziation eines Ii-Trimers mit drei $\alpha\beta$ -Heterodimeren kann der MHC II/Ii-Komplex das ER verlassen (Roche et al., 1991; Lamb und Cresswell, 1992). Ein Überschuss an freier Ii verbleibt in oligomerer Form im ER (Sung und Jones, 1981; Machamer und Cresswell, 1982; Marks et al. 1990). Der nonamere MHC II/Ii-Komplex wird durch das endosomale Sortierungssignal der Ii über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in spezifische endocytotische Kompartimente gelenkt (Lamb et al., 1991; Peters et al., 1991; Amigorena et al., 1994; Amigorena et al., 1995). In diesen Kompartimenten (MIICs: MHC class II compartments oder CIIVs: Class II-enriched vesicles) wird die Ii proteolytisch gespalten (Blum und Cresswell, 1988; Maric et al., 1994). In der Peptid-Bindungsgrube der Klasse II-Moleküle bleiben Ii-Fragmente (CLIP: class II-associated invariant chain peptides) zurück, die dort vor dem Verdau durch Proteasen geschützt sind (Ghosh et al., 1995). Diese Ii-Fragmente werden anschließend mit Hilfe eines weiteren im MHC codierten Proteins, dem HLA-DM Molekül, aus der Peptid-Bindungsgrube des Klasse II-Moleküls entfernt, die nun antigene Peptide binden kann (Sherman et al., 1995; Sloan et al., 1995; Denzin und Cresswell, 1995). DM interagiert dabei vermutlich direkt mit MHC Klasse II-Molekülen (Sanderson et al., 1996; Denzin et al., 1996).

Verschiedene funktionelle Regionen innerhalb der Ii sind identifiziert. In den ersten 20 aa der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne liegt die Signalsequenz, die für den intrazellulären Transport der Ii/Klasse II-Komplexe zu endosomalen Kompartimenten und deren Retention in den Endosomen verantwortlich ist (Bakke und Dobberstein, 1990; Lotteau et al., 1990). Die hydrophobe Transmembranregion (Maus Ii: aa 31-56) ist für die Translokation des C-Terminus in das ER-Lumen mitverantwortlich (Lipp und Dobberstein, 1986). Ebenso scheint die transmembrane Domäne für die Initialisierung der Trimerisierung wichtig zu sein (Ashman and Miller, 1999). Die Trimerisierungsdomäne selbst ist in der C-terminalen Region (Maus Ii: aa 118-193) lokalisiert. Die Assoziationsstelle für Klasse II-Moleküle (CBS: class II binding site) liegt im luminalen Bereich der Ii und erstreckt sich bei der Ii der Maus über die aa 81-109 (Freisewinkel et al., 1993; Bijlmakers et al., 1994; Romagnoli und Germain, 1994). Sie kann in einen promiskuitiv-bindenden Bereich (PBS: aa 81-87) und einen Allel-spezifisch Grube-bindenden Bereich (GBS: aa 91-99) unterteilt werden (Siebenkotten et al., 1998). Die N-terminal gelegene PBS-Region findet sich in vielen Ii-Fragmenten (CLIP) und bindet außerhalb der Klasse II Peptid-Bindungsgrube. Sie stabilisiert zusammen mit der C-

terminal angrenzenden Region den Grube-bindenden Bereich (Thayer et al., 1999). Es werden neben dieser Hauptbindungsstelle für Klasse II-Moleküle noch eine Serie kleinerer Kontaktstellen vermutet, die sich vom Transmembranbereich über das luminale Segment der Ii erstrecken (Castellino et al., 2001).

1.1.3 Funktion der Invarianten Kette bei der Antigenpräsentation

Die Invariante Kette hat großen Einfluss auf die Antigenpräsentation durch MHC II-Moleküle, was anhand von Untersuchungen mit Ii-negativen Zelllinien und Ii-defizienten Mäusen deutlich wird (Cosgrove et al., 1991; Stockinger et al., 1989; Bikoff et al., 1993; Viville et al., 1993; Elliott et al., 1994). Während die Ii für die Präsentation einiger nativer Antigene (z.B. Influenza-Virus-Protein) unbedingt erforderlich ist (Stockinger et al., 1989), scheint sie auf die Präsentation anderer Antigene (z.B. Ribonuklease A, Masern-Virus Proteine) keinen Einfluss zu haben (Sekaly et al., 1988; Peterson und Miller, 1990; Nadimi et al., 1991). Man fand weiterhin heraus, dass die Ii-abhängige Antigenpräsentation Epitop-spezifisch ist. Während einige Epitope eines Antigens in Anwesenheit der Ii verstärkt präsentiert werden, bleiben andere Epitope des gleichen Antigens in ihrer Präsentation unbeeinflusst (Bertolino et al., 1991; Momburg et al., 1993). Wahrscheinlich ist die Existenz Ii-abhängiger und Ii-unabhängiger Prozessierungskompartimente, die ein unterschiedliches Reservoir an antigenen Epitopen liefern und somit eine vielfältige Präsentation von Antigenen garantieren (Ceman und Sant, 1995).

Die Ii ist ein multifunktionales Molekül, dass die Antigenpräsentation über verschiedene Mechanismen beeinflussen kann:

- Chaperon- und Transportfunktion

Beim Zusammenbau und Faltungsprozess neusynthetisierter MHC Klasse II-Moleküle spielt die Ii eine ebenso wichtige Rolle wie beim Transport der Klasse II-Moleküle aus dem ER zu endosomalen/lysosomalen Kompartimenten. In Milzzellen Ii-defizienter Mäuse gelangt die Mehrzahl der Klasse II-Moleküle nicht an die Zelloberfläche sondern verbleibt im ER (Bikoff et al., 1993; Viville et al., 1993; Elliott et al., 1994). Die Klasse II-Moleküle im ER zeigen eine atypische Konformation und bilden Aggregate mit ER-ständigen Chaperonen (grp94, Erp72, p74, BiP), die neben dem fehlenden endosomalem Transportsignal der Ii, für die Retention der Klasse II-Moleküle mitverantwortlich sind (Schaiff et al., 1992; Nijenhuis und Neefjes, 1994; Bonnerot et al., 1994; Elliott et al., 1994). Die ohne Ii gebildeten Klasse II-Dimere an der Zelloberfläche sind meist instabil

und nicht mit Peptid beladen. Ihre Struktur ist verändert, was mit konformationsabhängigen Antikörpern gezeigt werden konnte (Peterson und Miller, 1990 und 1992; Elliott et al., 1994; Viville et al., 1993; Bikhoff et al., 1993). Ii-defiziente Mäuse können die meisten Antigene nur noch sehr schwach oder gar nicht mehr präsentieren, was neben einer verminderten Klasse II-Expression auch durch eine veränderte T-Zellpopulation (verminderte Anzahl an CD4⁺T-Zellen) zustande kommt.

In Ii-negativen Maus- und Rattenfibroblasten findet jedoch nach Transfektion von MHC Klasse II-Molekülen ein Transport der Klasse II-Moleküle zu endosomalen/lysosomalen Kompartimenten statt (Simonsen et al., 1993; Hitzel et al., 1995).

- Direkter Einfluss auf Bindung antigener Peptide

Durch die Assoziation der Ii mit MHC II-Molekülen wird die Peptidbindungsgrube des Klasse II-Moleküls mit CLIP besetzt. In Peptidbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von CLIP an die MHC II Peptid-Bindungsgrube den Transport der Klasse II-Moleküle zum Golgi-Komplex reguliert und folglich mit Klasse II-Molekülen eine strukturelle Einheit bildet (Zhong et al., 1996). In Ii-negativen Zelllinien konnte keine Assoziation endogener Peptide mit MHC Klasse II-Molekülen nachgewiesen werden (Busch et al., 1995; Hitzel et al., 1995), da diese meist direkt auf Klasse I-Moleküle geladen werden und mit Klasse II-Molekülen keine strukturelle Einheit bilden.

Eine Bindung von antigenen Peptiden an MHC Klasse II-Moleküle kann erst nach vollständiger Ablösung der Ii erfolgen (Roche und Cresswell, 1990 und 1991; Teyton et al., 1990; Roche et al., 1992; Newcomb und Cresswell, 1993). Das letzte mit Klasse II-Molekülen assoziierende Ii-Fragment CLIP bindet in der Peptidbindungsgrube des Klasse II-Moleküls und verhindert die Bindung antigener Peptide (Teyton et al., 1990; Rudensky et al., 1991; Riberdy et al., 1992; Roche et al., 1992; Gosh et al., 1995). Die Entfernung von CLIP aus der Grube des Klasse II-Moleküls erfolgt mit Hilfe von HLA-DM (Sloan et al., 1995; Denzin und Cresswell, 1995). In DM-negativen Zelllinien findet man eine Akkumulation von MHC Klasse II/CLIP-Komplexen (Riberdy et al., 1992; Sette et al., 1992). APCs DM-negativer Mäuse zeigen Defizite in der Antigenpräsentation und exprimieren vorwiegend CLIP-beladene MHC Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche (Martin et al., 1996; Miyazaki et al., 1996; Fung-Leung et al., 1996). DM beeinflusst weiterhin das HLA-DR Peptidrepertoire dahingehend, dass nur langlebige stabile Klasse II/Peptid-Komplexe präsentiert werden (Kropshofer et al., 1996; van Ham et al., 1996; Weber et al., 1996).

1.2 Immunität gegenüber Viren

Trotz großer Erfolge bei der Bekämpfung viraler Infektionen (Pocken, Polio) sind Viren weltweit immer noch für Morbidität und Mortalität beim Menschen verantwortlich. Während Millionen von Jahren, die Viren mit ihren Wirten koexistieren, haben sie gelernt das Immunsystem des Wirtes gezielt zu manipulieren (Alcami und Koszinowski, 2000). Das Immunsystem kann Viren zwar über verschiedenste Mechanismen bekämpfen, die kurze Generationsdauer und schnelle Anpassung der Viren sowie deren häufige Wirtswechsel haben jedoch immer wieder zum Auftreten neuer viraler Infektionskrankheiten (AIDS, Hepatitis, hämorrhagisches Fieber) geführt (Ahmed und Biron, 1999).

Für eine erfolgreiche Verbreitung muss das Virus zunächst in empfängliche Zellen eines geeigneten Wirts eindringen und sich dort unter Ausnutzung des Wirtsproteinsyntheseapparates vermehren und ausbreiten. Anschließend kann das Virus den Wirt wechseln oder sich innerhalb des Wirtes zurückziehen (persistierende Viren), um nach Reaktivierung erneut auszubrechen.

Immunantwort des angeborenen Immunsystems:

Unmittelbar nach einer Virusinfektion werden Cytokine freigesetzt, die durch Leukozytenpopulationen des angeborenen Immunsystems und durch infizierte oder aktivierte Zellen (Fibroblasten, Endothelzellen) synthetisiert werden. Die Cytokine Interferon α und β (IFN- α und IFN- β) werden bei Virusinfektionen freigesetzt und behindern direkt die Virusreplikation durch Inhibierung der Proteinsynthese (Vilcek und Sen, 1996). Interferone besitzen immunregulatorische Funktionen, wie die Aktivierung Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen), Regulation der Genexpression anderer Cytokine und Cytokinrezeptoren, Lokalisation von Effektorzellen an den Infektionsort sowie die Induktion der MHC Klasse I-Moleküle zur Förderung einer CD8⁺ T-Zellantwort (Lindahl et al., 1976). Andere Cytokine wie der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), IFN- γ , Interleukin-12 (IL-12), IL-6, IL-10, IL-15 und TGF- β , werden nicht bei allen Virusinfektionen synthetisiert. Sie können sich jedoch ebenso wie IFN α/β gegenseitig verstärken und über immunregulatorische Effekte Viren bekämpfen (Ahmed und Biron, 1999).

Das Komplementsystem des Blutes besteht aus einer Reihe von Plasmaproteinen, die nach direkter oder indirekter Aktivierung durch Pathogene eine Kaskade von Reaktionen auslöst, die letztendlich in der Zerstörung des Pathogens endet. Komplementproteine können durch die Bindung an das Pathogen dessen Phagocytose einleiten. Andere Komplementproteine werden durch IgG und IgM gebundene Antikörper aktiviert und zerstören anschließend die von den Antikörpern gebundenen Viruspartikel.

Die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems, die bei der Abwehr viraler Infektionen in Erscheinung treten, sind NK-Zellen und Makrophagen. Durch Cytokine wie IL-12 werden NK-Zellen zur Produktion anderer Cytokine (IFN- γ) angeregt. IFN- α und - β aktivieren NK-Zellen zu einer erhöhten Cytotoxizität gegenüber Virus-infizierten Zellen, wodurch diese effizient lysiert werden (Gidlund et al., 1978; Santoli et al., 1978; Biron, 1997). NK-Zellen können über direkten Kontakt die Zielzelle zerstören, wenn auf dieser positive Signale vorhanden sind bzw. negative Signale fehlen. Positive Signale sind spezifische Antikörper gegen virale Determinanten auf infizierten Zellen. Diese werden durch den Fc-Rezeptor der NK-Zellen erkannt, wodurch die NK-Zellen wiederum aktiviert werden (ADCC: Antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität) (Trinchieri, 1989). Als negative Signale gelten MHC Klasse I-Moleküle auf der Zielzelle, die mit dem KIR-Rezeptor (Killing Inhibitory Receptor; Mensch) bzw. LY49-Rezeptor (Maus) der NK-Zellen interagieren und die NK-zellvermittelte Cytotoxizität hemmen (Colonna M., 1996; Lanier L.L., 1997; Moretta A. und Moretta L., 1997; Parham P., 1997).

Makrophagen wandern im Körper umher und gelangen in verschiedene Organe. Sie können Viren durch Phagozytose aufnehmen und zerstören. Viele Viren sind in der Lage Makrophagen zu infizieren, um sich dann durch die Migration der Makrophagen im Körper auszubreiten (Cafruny und Bradley, 1996). Neben ihrer direkten antiviralen Funktion produzieren Makrophagen auch immunregulatorische Cytokine wie das antivirale Cytokin TNF- α oder IL-12. Außerdem sind Makrophagen sehr wichtig für die Prozessierung und Präsentation viraler Antigene gegenüber Lymphozyten des spezifischen Immunsystems (Ahmed und Biron, 1999).

Immunantwort des spezifischen Immunsystems:

Antikörper und T-Zellen sind zwei Haupteffektoren des spezifischen Immunsystems bei der Bekämpfung viraler Infektionen (Zinkernagel et al., 1996; Doherty et al., 1997). Antikörper können sowohl freie Viruspartikel als auch Virus-infizierte Zellen erkennen. Sie kontrollieren Virusinfektionen durch die Neutralisierung von Viruspartikeln, die sich

nach der Bindung von Antikörpern nicht mehr von Zelle zu Zelle verbreiten können. Wie bereits erwähnt können an Viruspartikel gebundene Antikörper das Komplementsystem aktivieren und die Phagocytose über Phagozyten mit Fc-Rezeptoren fördern. Die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC) führt zur Zerstörung Virus-infizierter Zellen. Antikörper, die an virale Glykoproteine auf der Zelloberfläche infizierter Zellen binden, können auch für eine verringerte Expression viraler Gene im Inneren der infizierten Zelle verantwortlich sein (Fujinami and Oldstone, 1984). IgA Antikörper in den Schleimhäuten blockieren den Viruseintritt, IgG-Antikörper im Serum sollen die virale Ausbreitung im Körper verhindern. Die Serum IgG-Antwort ist langlebig und kann über mehrere Jahre anhalten, was bei einer Reinfektion zur raschen Virus-Eliminierung führt.

Im Gegensatz zu Antikörpern, die in erster Linie eine Abwehr gegen freie Viruspartikel bilden, erkennen T-Zellen virales Antigen nur in Assoziation mit MHC Molekülen und richten somit ihre antivirale Aktivität auf infizierte Zellen. T-Zellen werden in zwei Klassen unterteilt: $CD4^{+}$ - und $CD8^{+}$ -T-Zellen. $CD4^{+}$ T-Zellen erkennen mit Hilfe ihres Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) virale Peptide nur in Assoziation mit MHC Klasse II-Molekülen, $CD8^{+}$ T-Zellen hingegen erkennen virale Peptide, die an MHC Klasse I-Moleküle binden. Alle viralen Proteine sind potentielle Ziele für die T-Zell-Erkennung.

$CD8^{+}$ T-Zellen werden auch als cytotoxische T-Zellen (CTL) bezeichnet. Sie kontrollieren Virusinfektionen primär durch das direkte Abtöten infizierter Zellen (Berke, 1994). Dabei verwenden sie zwei verschiedene Mechanismen: 1. Durch die Sekretion von Perforin, einem Porenbildner, und Granzymen wird die Plasmamembran der Zielzelle durchlöchert und somit durchlässig für Wasser und kleine Ionen. 2. Durch die Hochregulation des Fas-Liganden (FasL) auf T-Zellen kann dieser an den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle binden oder diesen quervernetzen, was zur Apoptose in der Fas-positiven Zelle führt (Kagi et al., 1994). Beide Mechanismen werden erst nach Aktivierung der $CD8^{+}$ T-Zellen durch ein geeignetes Antigen initiiert. $CD8^{+}$ T-Zellen kontrollieren auch das Viruswachstum durch die Produktion antiviraler Cytokine wie $IFN-\gamma$ und TNF. Sowohl die Cytokinausschüttung als auch die T-zellvermittelte Zerstörung infizierter Zellen sind wichtige Mechanismen bei der Bekämpfung viraler Infektionen durch $CD8^{+}$ T-Zellen. Bei cytolytischen Viren (HSV, Polio), die ihre Wirtszelle lysieren, wirken jedoch antivirale Cytokine effektiver. Bei nicht-lytischen Viren ist der Hauptabwehrmechanismus das direkte Abtöten der Zielzelle (Biron, 1994; Oldstone, 1996).

$CD4^{+}$ T-Zellen sind notwendig für eine optimale Antikörper- und $CD8^{+}$ -T-Zellantwort. Sie sind ebenfalls in der Lage antivirale Cytokine wie $IFN-\gamma$ und TNF zu produzieren

(Koszinowski et al., 1991; Biron, 1994; Doherty et al., 1997). Ein Defizit an $CD4^+$ T-Zellen wirkt sich direkt auf die Kontrolle von Virusinfektionen aus. Wie mit MHC Klasse II- und $CD4^+$ -defizienten Mäusen (Christensen et al., 1994; Ghiasi et al., 1997) gezeigt werden konnte und auch an AIDS-Patienten deutlich wird, steht ein $CD4^+$ -Defizit im Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für Virusinfektionen (McMichael et al., 1997; Perelson et al., 1997). Nach Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen durch ein Proteinantigen können diese sich zu zwei Subklassen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen entwickeln: T-Helferzellen (Th2-Typ) und T-Entzündungszellen (Th1-Typ). Die Th1-Zellen produzieren vorwiegend IL-2, TNF und IFN- γ und sind für die Aktivierung von Makrophagen verantwortlich. Th2-Zellen setzen IL-4 und IL-5 frei und unterstützen dadurch B-Zellen bei der Antikörperproduktion. Im Gegensatz zu parasitären Infektionen, die eine starke Polarisierung in der $CD4^+$ T-Zellantwort zeigen, treten bei Virusinfektionen sowohl Th2- als auch Th1-Antworten auf (Wasik et al., 1997; Alonso et al., 1997).

Der Bedarf einer $CD4^+$ T-Zellhilfe für die Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort ist virusabhängig. Das LCMV (Lymphozytärer Choriomeningitis-Virus) gibt einen starken Stimulus für die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen und löst eine $CD4^+$ -unabhängige CTL-Antwort aus (Ahmed et al., 1988; Matloubian et al., 1994). Im Gegensatz dazu sind die CTL-Antworten gegenüber HSV und Influenza Virus $CD4^+$ -abhängig, da sie weniger $CD8^+$ T-Zellen aktivieren (Viola und Lanzavecchia, 1996; Sebzda et al., 1997). Obwohl eine $CD4^+$ T-Zellhilfe nicht immer für die Induktion einer CTL-Antwort benötigt wird, sind $CD4^+$ T-Zellen jedoch notwendig für die Aufrechterhaltung einer CTL-Antwort während chronischer Virusinfektionen (Saha und Wong, 1992; Matloubian et al., 1994; Cardin et al., 1996; Rosenberg et al., 1997).

1.2.1 Virale Strategien zur Verhinderung einer Immunantwort

Die vielfältige Immunantwort stellt eine Herausforderung für Viren dar, die innerhalb ihres Wirtes für einen gewissen Zeitraum überleben und sich vermehren müssen, um dann auf andere anfällige Individuen überzugehen (Gewurz et al., 2001). Im Laufe der Zeit haben Viren viele verschiedene Strategien entwickelt, um der Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen. Sie inhibieren die MHC-vermittelte Antigenpräsentation und die NK-Zelllyse, beeinflussen die Apoptose und hemmen Cytokine sowie humorale Immunantworten (Tortorella et al., 2000).

- MHC I-restringierte Antigenpräsentation: Verschiedene Herpesviren (EBV, HSV und CMV), HIV und Adenoviren hemmen die MHC I-Antigenpräsentation über virale Genprodukte. Schon sehr früh greift das EBNA-1 Protein (EBV) in den Prozess der Antigenpräsentation ein, indem es die proteasomabhängige Proteindegradation im Cytosol inhibiert. Das US6-Protein (HCMV) und das ICP47-Protein (HSV) hemmen TAP und verhindern somit den Peptidtransport ins ER (Hill et al., 1995; Fruh et al., 1995; Hengel et al., 1996 und 1997; Ahn et al., 1997; Lehner et al., 1997). Das E3-Protein (Adenovirus) und das US3-Protein (HCMV) bewirken eine Retention von Klasse I-Molekülen im ER (Jones et al., 1996; Mahr und Gooding, 1999). Andere Proteine wie US2, US11 (HCMV) und Vpu (HIV) destabilisieren neu synthetisierte MHC Klasse I-Moleküle oder sind für ihre vorzeitige Degradation verantwortlich (Wiertz et al., 1996 a und 1996 b; Kerkau et al., 1997).
- MHC II-restringierte Antigenpräsentation: Im Gegensatz zur MHC I-Antigenpräsentation sind hier nur wenige hemmende Virusproteine bzw. Mechanismen bekannt. Das E1A-Protein (Adenovirus) und das IE/E Genprodukt (HCMV) verringern die Klasse II-Expression durch Blockade der IFN-Signal-Transduktionskaskade (Miller et al., 1998 und 1999; Leonard und Sen, 1997). Das US2-Protein (HCMV) ist für die Degradation der HLA-DR und HLA-DM α -Ketten verantwortlich (Wiertz et al., 1996 a; Tomazin et al., 1999). Bei zwei anderen Proteinen, dem E5-Protein (HPV) und dem Nef-Protein (HIV), wird eine Beeinflussung der MHC Klasse II-Prozessierung durch Ansäuerung der endosomalen Vesikel vermutet (Andresson et al., 1995; Piguet et al., 1999).
- NK-Zelllyse: Virus-infizierte Zellen deren Oberflächen-Klasse I-Expression verringert ist, werden normalerweise von NK-Zellen lysiert. Daher sind einige Viren in der Lage MHC Klasse I-Homologe (UL18-Protein: HCMV, m144-Protein: MCMV) zu produzieren, die an die Oberfläche infizierter Zellen gelangen und somit die Zelllyse durch NK-Zellen verhindern (Beck und Barrell, 1988; Farrell et al., 1997).
- Apoptose: Cytotoxische T- und NK-Zellen können Apoptose durch die Sekretion cytotoxischer Cytokine wie TNF oder über die Interaktion zwischen FasL und Fas-Rezeptor auf der Zielzelle induzieren. Adenoviren codieren für eine Reihe von Proteinen, die die Internalisierung des Fas-Rezeptors und dessen lysosomale Degradation forcieren (Shisler et al., 1997; Elsing und Burgert, 1998; Tollefson, 1998). Das Kuhpockenvirus sekretiert TNF-Homologe (CrmB, CrmC, CrmD), die TNF auf unterschiedliche Weise neutralisieren (Hu et al., 1994; Smith et al., 1996; Loparev et al., 1998). Caspasen stellen eine Gruppe von Cystein-Proteasen dar, die die Apoptose dirigieren. Die Proteine p35 und

IAP der Baculoviren inhibieren verschiedene Caspasen (Miller, 1997; Devereaux und Reed, 1999). Viele Viren hemmen auch Bcl-2, eine Proteinfamilie die für die Regulation der Apoptose verantwortlich ist. Einige Herpesviren (EBV, HHV-8) bilden z.B. Bcl-2-Homologe oder unterdrücken die Expression von zellulärem Bcl-2 (Henderson et al., 1991 und 1997; Cheng et al., 1997). Adenoviren und SV40 beeinflussen den Zellzyklus. Sie hemmen die Apoptose über Inaktivierung oder Degradation von p53, einem Protein, das die Zellvermehrung kontrolliert (Yew und Berk, 1992; Mietz et al., 1992; Scheffner et al., 1993; Moore et al., 1996).

- Cytokinaktivität: Um dem Angriff durch antivirale Cytokine zu entgehen, hemmen viele Viren die Cytokinsynthese, inaktivieren Cytokine, blockieren den Cytokinrezeptor der Wirtszelle oder produzieren Cytokin-Homologe. Betroffen sind vor allem die Cytokine TNF, IFN- α , - β , - γ und IL-12. Einige Herpesviren (EBV, HHV-8 und HSV) und Adenoviren hemmen auf verschiedenste Weise die Wirkung der Interferone (Aman und von Gabain, 1990; Leonard und Sen, 1997; He et al., 1997; Burysek et al., 1999). Das Masern Virus inhibiert über Hämagglutinin die IL-12 Produktion (Karp et al., 1996). EBV synthetisiert ein IL-10-Homolog (BCRF1-Protein), das antagonistisch zu einer Th1-Antwort wirkt (Liu et al., 1997). Vaccinia- und Kuhpocken-Viren sekretieren Homologe des IFN- γ -Rezeptors (Alcami und Smith, 1995).

- Humorale Immunantwort: Da auch die Immunglobuline und das Komplementsystem zur Bekämpfung einer Virusinfektion beitragen, sind sie auch Angriffspunkte von Viren. Phagozytierende und cytotoxische Zellen erkennen über ihren Fc-Rezeptor Immunglobuline, die an Viren oder Virus-infizierte Zellen gebunden sind. Das Komplementsystem kann Antikörper/Virus-Komplexe direkt angreifen. Es gibt einige Viren (HSV, EBV, Vaccinia Virus, Pocken Virus) die durch Produktion viraler Homologe einzelne Komponenten des Komplementsystems inaktivieren (Mold et al., 1988; Kotwal et al., 1990; Kostavasili et al., 1997; Lalani et al., 1999). Vor allem Herpesviren (HSV, HCMV, VZV) produzieren Homologe zum Fc-Rezeptor, die in der äußeren Membran von Viren oder infizierten Zellen lokalisiert sind und durch die Bindung von IgG antigene Strukturen verdecken (Johnson et al., 1988; Litwin et al., 1992; MacCormac und Grundy, 1996; Lubinski et al., 1998).

Es sind hier nicht alle viralen Genprodukte aufgelistet, die einen direkten Einfluss auf die Immunantwort ausüben. Es wird jedoch deutlich, dass viele verschiedene Virenfamilien das Immunsystem mit ähnlichen Strategien überlisten. Neben der Produktion viraler Proteine gehen viele Viren innerhalb ihres Wirtes in eine Latenzphase über, in der die

Expression ihrer viralen Genprodukte heruntergeschaltet ist und sie somit der Erkennung durch Antikörper entgehen. Das latente Virus kann durch exogene oder endogene Faktoren stimuliert werden und geht dann wieder in eine lytische Phase über, die mit der Produktion und Freisetzung neuer infektiöser Viruspartikel einhergeht. Einige Viren sind sogar in der Lage die immunkompetenten B- und T-Zellen (z.B. HIV, EBV) zu infizieren. Andere infizieren Regionen innerhalb des Wirtes, die nur schlecht durch das Immunsystem überwacht werden, wie z. B. die Neurone (HSV) (Lorenzo et al., 2001).

1.3 HSV und das Immunsystem

Die *Herpesviridae* sind eine große Familie von Viren, die alle Arten von Vertebraten infizieren können. Alle Herpesviren haben eine ähnliche morphologische Struktur, besitzen ein großes lineares doppelsträngiges DNA Genom (>100kb) und die Fähigkeit zur Latenz (Subak-Sharpe und Dargan, 1998). Im Laufe der Zeit haben Herpesviren eine Reihe verschiedenster Gene aus dem Genom ihres Wirtes, wahrscheinlich über nicht-homologe Rekombination, übernommen (Sharp, 2002).

Zu den humanen Herpesviren gehören 8 verschiedene Virusgruppen (Herpes Simplex Virus Typ1 und Typ2, humanes Cytomegalievirus, Varizella-Zoster-Virus, Epstein-Barr-Virus, humanes Herpes Virus 6 und 7, das Kaposi-Sarkom begleitende humane Herpesvirus 8), die allesamt pathogen sind und eine wichtige Rolle in der öffentlichen Gesundheit spielen. (Boehmer und Lehman, 1997).

HSV-1 ist das am häufigsten untersuchte Virus. Das Virion besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid (Core), das das virale Genom beherbergt, dem Tegument, das das Kapsid umschließt und einer äußeren Membranhülle (envelope) aus Lipiden, die an der Oberfläche mit Proteinen gespickt ist. Bei einer HSV-Infektion muss sich das Virus an die Zellmembran der Wirtszelle anheften und diese durchdringen. Hierbei fusioniert die virale Hülle mit der Zellmembran und die Capsid-Tegument Struktur gelangt ins Cytoplasma und anschließend zum Zellkern, wo die virale DNA in den Zellkern freigesetzt wird. Die normale zelluläre DNA- und Proteinsynthese wird herunterreguliert, sobald die Virusreplikation beginnt. Das 152 kbp große DNA-Molekül kodiert ca. 75 Proteine, von denen 30 % essentiell für die Virusvermehrung sind. Die viralen Proteine werden entsprechend der drei Kategorien der HSV-Gene (α , β und γ -Gene) als α , β und γ -Proteine bezeichnet und zwischen 2-4, 5-7 und 15-18 Stunden nach der Infektion exprimiert. Die früh exprimierten α -Proteine dienen als Transaktivator für die später exprimierten

Proteine. Die β -Proteine beinhalten Enzyme, die für die Virusreplikation notwendig sind. Zum Schluss werden die viralen Strukturproteine (γ -Proteine) gebildet (Lehman und Boehmer, 1999).

Das klinische Bild einer HSV-Infektion ist die Bläschenbildung auf der Haut und den Schleimhäuten. Die akute Virusvermehrung findet *in vivo* in den Epithelzellen des Nasen-Rachen-Raumes, der Augen und Genitalien statt. Nach der Primärinfektion kann HSV lebenslang in den Spinalganglien des Rückenmarks und in den Ganglien des zentralen Nervensystems des Wirtes latent persistieren, ohne neue Viruspartikel zu produzieren. Durch exogene und endogene Faktoren wie hormonelle, psychische, Stress bedingte, traumatische, chemische und physikalische Einflüsse kann das Virus reaktiviert werden. Das reaktivierte Virus gelangt von den Ganglien durch die Neuronen bis zu den Zielzellen des primären Infektionsherdes und verbreitet sich dort von Zelle zu Zelle (Whitney, 1990; Gorbach et al., 1992; Becker und Darai, 1994).

HSV ist weltweit verbreitet und kommt unter natürlichen Bedingungen nur beim Menschen vor. *In vitro* zeigt das Virus einen sehr breiten Wirtsbereich und kann neben Affen auch Nager infizieren. Es sind zwei Serotypen bekannt: HSV Typ1 und HSV Typ2. Typ1 (HSV-1) infiziert hauptsächlich Zellen der Mundregion. Die Primärinfektion mit HSV-1 erfolgt vorwiegend im Säuglings- und Kindesalter durch Tröpfchen- oder Kontaktinfektion und verläuft in über 90% der Fälle asymptomatisch. Die Durchseuchungsrate beträgt im Erwachsenenalter über 90%. In seltenen Fällen kann sich eine HSV-1 Infektion auch im Gehirn ausbreiten und dort zu einer Herpesenzephalitis führen, die unbehandelt zum Tode führen kann. HSV Typ2 (HSV-2) ist dagegen überwiegend auf die Genitalregion beschränkt. Die Durchseuchungsrate liegt deutlich unter der von HSV-1. Während der Geburt kann HSV-2 von der Mutter auf das Neugeborene übertragen werden (Herpes neonatorum), was unbehandelt fast immer tödlich verläuft. Auch dieses schwere Krankheitsbild tritt jedoch nur selten auf (Whitney, 1990; Gorbach et al., 1992).

Immunantwort gegen HSV:

Um die Komplexität des Virus-Wirt-Verhältnisses genauer ergründen zu können, sind Tiermodelle sehr hilfreich. Mit HSV-infizierten Mäusen konnten verschiedene Mechanismen der Immunantwort aufgedeckt werden (Nash, 2000). Zu Beginn einer HSV-Infektion treten antivirale Interferone sowie NK-Zellen auf, die eine Ausbreitung des Virus auf das Nervensystem möglichst verhindern sollen (Karupiah et al., 1993; Tanigawa et al.,

2000). In der adaptiven Immunantwort sind vor allem T-Zellen zur Bekämpfung einer Primärinfektion notwendig. Sowohl CD8⁺cytotoxische T-Zellen als auch CD4⁺T-Helferzellen tragen zur Zerstörung Virus-infizierter Zellen bei (Bonneau und Jennings, 1989; Cose et al., 1997; Jones et al., 2000). Nach HSV-Infektionen tritt sowohl beim Menschen als auch in der Maus eine Subpopulation von cytotoxischen CD4⁺T-Zellen auf, die direkt an der Zerstörung Virus-infizierter Zellen beteiligt sind (Schmid, 1988; Torpey et al., 1989; Yasukawa et al., 1989; Kolaitis et al., 1990). Epidermale Keratinozyten die vor einer HSV-Infektion mit IFN- γ behandelt wurden und dadurch vermehrt HLA-DR und nach Infektion auch MHC Klasse I-Moleküle exprimieren, sind anfälliger für cytotoxische CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen (Mikloska et al., 1996). CD4⁺Th1-Zellen locken durch die Freisetzung von IFN- γ Makrophagen zum Infektionsort und aktivieren diese (Preston, 2000). Makrophagen wiederum begrenzen die HSV-Infektion unter anderem durch Freisetzung antiviraler Cytokine wie TNF- α (Kodukula et al., 1999). CD4⁺Th2-Zellen sind wichtig für die Aktivierung von B-Zellen zur Produktion neutralisierender Antikörper. B-Zellen und Makrophagen fungieren außerdem als antigenpräsentierende Zellen (Deshpande et al., 2000).

Sowohl MHC I- als auch MHC II-Antworten sind bei der Bekämpfung einer HSV-Infektion notwendig. Mit HSV-1 geimpften, Klasse I bzw. Klasse II knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine MHC II-Antwort die Mäuse vor einem tödlichen Verlauf der Infektion schützen kann, was auf die Produktion neutralisierender Antikörper zurückzuführen ist (Ghiasi et al., 1997). Sobald eine Infektion der Epithelzellen stattgefunden hat, sind neutralisierende Antikörper uneffektiv. Wandert das Virus jedoch nach Reaktivierung von einem Kompartiment zum anderen, z.B. von einer Nervenendigung zu Epithelzellen oder umgekehrt, dann wird es für neutralisierende Antikörper angreifbar (Simmons and Nash, 1985; Nash, 2000). Die meisten antigenen Determinanten, die neutralisierende Antikörper erkennen, sind in den Glykoproteinen der Virushülle lokalisiert.

HSV-1 kann sowohl in Neuronen persistieren als auch in Hornhautepithel, Lymphozyten und Makrophagen (Levine et al., 1980; Kulesar et al., 1990; Openshaw et al., 1995; Bustos und Gómez, 1999). Bei einer Primärinfektion des Nervensystems wurde eine stärkere CD8⁺-Antwort gegen infizierte Ganglienzellen beobachtet (Simmons und Tschärke, 1992). Nach Bekämpfung der akuten Infektion verweilen CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen für längere Zeit am Infektionsort, wo CD8⁺T-Zellen die Virusreaktivierung hemmen (Liu et al., 2000;

Shimeld et al., 1999). Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt, aber wahrscheinlich sind eher Cytokine wie IFN- γ , TNF- α und IL-6 für eine unterdrückte Reaktivierung verantwortlich als cytolytische Mechanismen (Shimeld et al., 1999). Im Gegensatz zum Menschen treten bei HSV-infizierten Mäusen selten Reaktivierungen auf, was auf die effektive T-Zellantwort in Umgebung der latent infizierten Ganglien zurückzuführen ist (Nash, 2000).

HSV-Strategien:

Latenz ist die beste Strategie, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen und für unbestimmte Zeit in einem Wirt zu persistieren. Durch die Infektion des Nervensystems, wo natürlicherweise eine verminderte Immunantwort aufgrund einer geringeren MHC Klasse I-Expression vorliegt, verschafft sich HSV einen weiteren Vorteil. HSV ist in der Lage, die aktiven Zellen der Immunantwort (T-Zellen, B-Zellen, Dendritische Zellen (DCs) und Makrophagen) zu infizieren um diese direkt anzugreifen oder sich mit deren Hilfe im Körper auszubreiten. Menschliche T-Zellen exprimieren einen HVEM-Rezeptor (herpesvirus entry mediator), über den das Virus in die Zelle gelangen kann (Montgomery et al., 1996). Die HSV-1 Infektion aktivierter T-Zellen führt zu deren Apoptose (Ito et al., 1997; Raftery et al., 1999). Auch humane B-Zelltumoren besitzen den HVEM-Rezeptor und sind mit HSV infizierbar. HSV-infizierte lymphoblastoide B-Zellen können CD4⁺T-Zellen nicht mehr aktivieren und hemmen deren Cytokinproduktion (Eling et al., 2000; Barcy und Corey, 2001). HSV-infizierte DCs sind in ihrer Reifung und Cytokinproduktion gehemmt und verlieren dadurch ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren (Salio et al., 1999; Kruse et al., 2000).

Einige virale Proteine, über die HSV-1 die Immunantwort auf verschiedenste Weise manipulieren kann, sind inzwischen identifiziert: In HSV-infizierten Hautzellen ist der Transport von Klasse I-Molekülen zur Zelloberfläche gehemmt, was möglicherweise ein Effekt des viralen UL41 Genproduktes ist (Hill et al., 1994). Das HSV-Protein ICP47 bindet an TAP und verhindert dadurch die Translokation von Peptiden aus dem Cytoplasma ins ER. Nicht beladene MHC I-Moleküle verbleiben im ER, wodurch die CD8⁺T-Zellantwort blockiert wird. (Ahn et al., 1996; Schust et al., 1996; Galocha et al., 1997; Goldsmith et al., 1998).

Das virale Glykoprotein gC in der Virushülle schützt vor Neutralisierung durch das Komplementsystem (McNearney et al., 1987; Friedman et al., 1996 und 2000; Kostavasili et al., 1997; Lubinski et al., 1999).

Die viralen Glykoproteine gE und gI, ebenfalls in der Virushülle lokalisiert, stellen FcRezeptor-Homologe dar, die mit hoher Affinität IgG binden. In *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass IgG-Aggregate, die an FcR-Homologe auf HSV-infizierten Zellen binden, diese Zellen vor einer Zelllyse durch Lymphozyten und das Komplementsystem sowie vor ADCC schützen (Frank und Friedman, 1989; Dubin et al., 1991; Van Vliet et al., 1992; Atherton et al., 2000).

Die HSV-1 Proteinkinase US3 schützt infizierte Zellen vor Apoptose (Leopardi et al., 1997).

Mit dem γ_1 34.5-Protein hemmt HSV-1 die IFN-induzierte Proteinsynthese, wodurch deren antivirale Wirkung nicht zum Tragen kommt (He et al., 1997).

1.3.1 HSV-1 Glykoprotein B (gB)

HSV-1 besitzt 11 Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL und gM) in seiner Virushülle, deren Funktion teilweise bekannt ist. Wie bereits erwähnt, sind gC, gE und gI Virusproteine, die die Immunantwort des Wirtes manipulieren können. Während alle Glykoproteine zur Virusinfektiosität und Virusverbreitung beitragen, sind gB, gD, gH und gL für die Virusreplikation essentiell (Cai et al., 1988a; Desai et al., 1988; Ligas und Johnson, 1988; Fuller und Lee, 1992; Hutchinson et al., 1992; Roop et al., 1993; Laquerre et al., 1998). HSV-1 kann ein breites Spektrum von Zellen infizieren. Die Infektion selbst ist jedoch eine komplexe Interaktion zwischen Glykoproteinen der Virushülle und Glykosaminoglykanen (GAGs) sowie Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Nach Anheftung des Virus an eine geeignete Zellmembran erfolgt die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, gefolgt vom Eintritt des Nukleokapsids in das Cytoplasma.

HSV-1 bindet über seine Hüllproteine gC und gB an GAGs auf der Zelloberfläche. Das Virus interagiert am häufigsten mit den GAGs Heparansulfat und Chondroitinsulfat (WuDunn und Spear, 1989; Spear et al., 1992). gC- und gB-defiziente Virusmutanten zeigen eine schwächere Bindung zur Zelloberfläche (Herold et al., 1991 und 1994). GAG-defiziente Zellen binden HSV-1 schwächer, können aber trotzdem infiziert werden (Gruenheid et al., 1993).

Für den Viruseintritt ist zusätzlich die Bindung an einen Zellrezeptor notwendig. Auf humanen Zellen wurden bisher 3 Rezeptorfamilien identifiziert: 1. HveA (herpesvirus entry mediator A = HVEM) ist ein Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und wird nur auf wenigen Zellen (T-Lymphocyten und leukämischen B-Zellen) exprimiert (Montgomery et

al., 1996; Eling et al., 2000). 2. Rezeptoren der Nectin-Familie werden auf vielen humanen Zellen exprimiert und vor allem in Geweben, die bekannterweise durch HSV-1 infiziert werden (Mendelsohn et al., 1989; Geraghty et al., 1998; Cocchi et al., 1998). 3. Zu 3-O-Sulfat-Heparansulfat modifizierte GAGs dienen als Eintrittsrezeptor für HSV-1 (Shukla et al., 1999). Das HSV-1 Virus kann nur über gD an alle drei Rezeptorfamilien binden (Krummenacher et al., 1998; Geraghty et al., 2000; Campadelli-Fiume et al., 2000; Pertel et al., 2001).

Die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran ist pH-unabhängig (Wittels und Spear, 1991) und wird durch gD, gB und das Heterodimer gH/gL induziert. Die vier Glykoproteine sind an der Bildung eines „Fusionsapparates“ beteiligt, der zu einer Membranverschmelzung in transfizierten COS-Zellen führt und somit auch an der Ausbreitung von Zelle zu Zelle mitwirkt (Turner et al., 1998; Rodger et al., 2001; Browne et al., 2001). Virusmutanten, denen eines dieser 4 Glykoproteine fehlt, können Zellen nicht infizieren (Cai et al., 1988a; Ligas und Johnson, 1988; Forrester et al., 1992; Roop et al., 1993). Monoklonale Antikörper gegen die 4 Glykoproteine gB, gD, gH und gL blockieren eine HSV-1 Infektion (Pereira et al., 1980; Para et al., 1985; Navarro et al., 1992; Peng et al., 1998).

Das Glykoprotein B übernimmt bei einer HSV-1 Infektion wichtige Funktionen. Neben der Fähigkeit zur Adsorption an GAGs auf der Zelloberfläche, ist es an der Fusion von Virushülle und Zellmembran sowie dem Viruseintritt beteiligt. gB wird an der Oberfläche infizierter Zellen exprimiert und kann dadurch die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle beeinflussen (Cai et al., 1988a; Herold et al., 1994; Laquerre et al., 1998).

Unter den von Herpesviren kodierten Glykoproteinen ist gB am stärksten konserviert. Das HSV-1 gB-Gen (UL27) ist in 3'–5'-Orientierung auf dem HSV-1 Genom lokalisiert (McGeoch et al., 1988). Von Bzik et al., (1984) und Pellett et al., (1985) wurde für das HSV-1 gB aus dem Stamm KOS und Stamm F eine Sekundärstruktur postuliert: Danach ist gB ein Typ I-Transmembranprotein, das nach Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz von 29 oder 30 aa (je nach HSV-1 Stamm) noch eine Länge von 874 aa aufweist. Die extracytoplasmatische Domäne ist 696 aa lang und enthält 6 N-Glykosylierungsstellen und 10 Cysteinreste. Die hydrophobe Transmembrandomäne durchzieht mehrfach die Membran und wird aus 69 aa gebildet. Die cytoplasmatische Domäne hat eine Länge von 109 aa. Das vollständig glykosylierte gB hat ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa und bildet in seiner biologisch aktiven Form Dimere

aus (Claesson-Welsh und Spear, 1986; Ali, 1990; Highlander et al., 1991). Das noch nicht glykosylierte gB assoziiert im ER mit Calnexin (Yamashita et al., 1996).

Innerhalb von HSV-1 gB wurden mehrere funktionelle Bereiche identifiziert: Die Transmembranregion enthält neben dem Membranverankerungssignal (Cai et al., 1988b) ein Lokalisationssignal für die nukleäre Kernmembran, da das Herpesvirus seine Hülle durch Knospung von der inneren Kernmembran erhält (Darlington und Moss, 1968; Gilbert et al., 1994). Die cytoplasmatische Domäne spielt eine Rolle bei der Fusion infizierter Zellen (Syncytium-Bildung), was durch *Syn*- und Deletions-Mutanten gezeigt werden konnte (Bond et al., 1982; Gage et al., 1993; Foster et al., 2001). Ein einzelner Aminosäureaustausch in diesem Bereich kann bereits für einen *Syn*-Phänotyp verantwortlich sein. Weiterhin beeinflussen einzelne Aminosäuren im Carboxyterminus und der Ektodomäne von gB (aa 851 bzw. aa 553) die Viruseintrittsrate von HSV-1 (Bzik et al., 1984). In der extracytoplasmatischen Domäne (Ektodomäne) ist der an die Transmembranregion angrenzende Bereich (aa 596–711) für die Oligomerisierung essentiell (Cai et al., 1988b; Ali et al., 1990; Qadri et al., 1991; Laquerre et al., 1996). Mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern und neutralisationsresistenten Virusmutanten (mAb^r-Mutanten) konnten noch 3 weitere funktionelle Bereiche in der externen gB-Domäne lokalisiert werden, die sowohl für die Virusfusion mit der Zellmembran und den Viruseintritt als auch für die Ausbreitung von Zelle zu Zelle und die Syncytium-Bildung verantwortlich sind (Highlander et al., 1988 und 1989; Pereira et al., 1989; Qadri et al., 1991). Hierbei handelt es sich um die N-terminale Domäne D1, die Domäne D2 im Zentrum der extracytoplasmatischen Region und die Domäne D5a, die an die Transmembranregion angrenzt.

Immunantwort gegen HSV-1 gB:

Die Glykoproteine von HSV-1 bieten aufgrund ihrer Exposition auf der Virushülle und der Zellmembranoberfläche wichtige Angriffspunkte für das Immunsystem. HSV-1 Infektionen induzieren sowohl gB-spezifische humorale Immunantworten als auch T-Zellantworten. Obwohl viele cytotoxische CD8⁺T-Zellantworten gegen früh exprimierte HSV-Proteine gerichtet sind (Martin et al., 1988), ist das spät exprimierte Strukturprotein gB in einigen Maus-Haplotypen Angriffsziel von cytotoxischen T-Zellen. H-2^d-restringierte CTLs aus BALB/c-Mäusen erkennen ein gB-Epitop zwischen den aa 233-379 (Witmer et al., 1990; Hanke et al., 1991). In C57BL/6-Mäusen sind 70-90 % aller CD8⁺ HSV-1-spezifischen T-Zellen gegen das gB-Epitop₄₉₈₋₅₀₅ gerichtet (Wallace et al., 1999).

In HSV-1 infizierten epidermalen Keratinozyten mit einer starken HLA-DR Expression sind neben gB auch noch gC und gD Hauptangriffsziele für CD4⁺cytotoxische T-Zellen (Mikloska und Cunningham, 1998).

Eine starke Immunantwort gegen HSV-1 wird durch neutralisierende Antikörper erreicht, die gegen Determinanten einiger viraler Glykoproteine gerichtet sind. Gegen das multifunktionelle gB wurden bereits einige Antikörper entdeckt, die für eine Virusneutralisierung und ADCC verantwortlich sind (Sanchez-Pescador et al., 1992 und 1993). Die Antikörper erkennen Epitope innerhalb der funktionalen Regionen von gB (D1, D2 und D5a) und können somit auch die verschiedenen Funktionen von gB hemmen (Pereira et al., 1989; Qadri et al., 1991; Navarro et al., 1992). Während gB und gD einen hohen Titer an neutralisierenden Antikörpern induzieren, finden sich gegen gG und gH keine neutralisierenden Antikörper (Blacklaws et al., 1990).

Viele HSV-1 Glykoproteine induzieren in Mäusen eine protektive Immunantwort und schützen sie somit vor einem tödlichen HSV-1 Verlauf (Bystrická et al., 1997). Immunität kann durch Immunisierung der Mäuse mit gB Plasmid-DNA oder rekombinanten gB-exprimierenden Viren erreicht werden (Cantin et al., 1987; Ghiasi et al., 1992; Manickan et al., 1995). Auch das deglykosylierte gB ist in der Lage, Mäuse vor einem tödlichen HSV-1 Verlauf zu schützen und ist damit genauso effektiv in der Induktion von T-Zellantworten wie das vollständig glykosylierte gB (O'Donnell et al., 1991).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Der Bereich der Invarianten Kette (Ii), der für die Assoziation mit MHC Klasse II-Molekülen notwendig ist, wurde in einer früheren Arbeit identifiziert und charakterisiert (Freisewinkel, 1995). Die MHC Klasse II-Bindungsstelle besitzt eine spezifisch in die MHC Klasse II-Grube bindende Region, deren Bindung durch flankierende Bereiche stabilisiert wird (Stumptner et al. 1997; Thayer et al. 1999). Der N-terminale flankierende Bereich ist für eine promiskuitive Bindung an verschiedene MHC II-Allotypen verantwortlich (Siebenkotten et al. 1998). Mit Hilfe der Datenbankrecherche konnte eine zur promiskuitiven Bindungsstelle identische Sequenz mit einem darauffolgenden Bindungsmotiv für Klasse II-Moleküle innerhalb des viralen Glykoprotein B (gB) vom Herpes simplex virus Typ1 (HSV-1) gefunden werden. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung dieser Sequenz für das gB ermittelt werden. Kann das HSV-1 Hüllprotein, das für die HSV-Infektion von Zellen und die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle verantwortlich ist, über diese potentielle Bindungsstelle mit MHC Klasse II-Molekülen assoziieren? Und wenn ja, welchen Vorteil verschafft sich das Virus dadurch? Es ist bekannt, dass HSV-1 über verschiedene Mechanismen verfügt, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen. Hierbei konzentriert es sich, wie viele andere Viren auch, auf die Unterdrückung einer $CD8^+$ T-Zellantwort durch eine verminderte MHC Klasse I-Expression. Da aber zur Kontrolle einer HSV-1 Infektion die $CD4^+$ T-Zellen ebenso wichtig sind, könnte über die Assoziation mit MHC Klasse II-Molekülen die $CD4^+$ T-Zellantwort beeinflusst werden.

Es sollte untersucht werden, ob diese Region innerhalb des gBs einer typischen Klasse II-Bindungsstelle, wie die der Ii entspricht, und ob sie die einzige an Klasse II-Moleküle bindende Region ist. Ferner sollte getestet werden, ob die potentielle Bindungsregion auch Peptid-Bindungseigenschaften für Klasse II-Moleküle besitzt und somit als ein mögliches Epitop in Frage kommt, das auf der Oberfläche HSV-infizierter Zellen durch MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden kann? Weiterhin sollte geklärt werden, ob die Assoziation zwischen gB und Klasse II zu einer Retention von Klasse II-Molekülen im ER oder anderen Kompartimente innerhalb der Zelle führt und dadurch die Oberflächenexpression von Klasse II-Molekülen und somit eine $CD4^+$ T-Zellantwort unterdrückt? Eine weitere Möglichkeit die $CD4^+$ T-Zellantwort zu beeinflussen, ist die Generierung eines veränderten Pools antigenen Peptide. Dies kann durch die Beeinflussung der Stabilität eines antigenen Proteins oder dessen Transport in andere Prozessierungskompartimente bzw.

Milieuänderungen in Prozessierungskompartimenten erreicht werden. Es stellt sich also die Frage, ob gB durch die Assoziation mit Klasse II-Molekülen in seiner Stabilität beeinflusst wird oder in andere Kompartimente transportiert wird. Wenn gB ebenso wie die Ii mit Klasse II-Molekülen assoziiert, können sie auch um die Bindung an MHC Klasse II-Moleküle konkurrieren. Kann gB die Funktion der Ii übernehmen und somit die Ii-abhängige Antigenpräsentation beeinflussen?

Wenn auf all diese Fragen Antworten gefunden werden, kann möglicherweise ein neuer Fluchtmechanismus aufgedeckt werden, über den HSV der Erkennung durch das Immunsystem entgehen kann.

2. Material und Methoden

Die verwendeten Chemikalien waren in der Regel von *pro analysis* Qualität. Soweit nicht gesondert gekennzeichnet, wurden sie von den Firmen ICN (Dortmund), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), BioRad (München) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

- Schnellpräparation kleiner Plasmidmengen

Eine 1,5 ml Übernachtskultur einer Bakterieneinzelkolonie wurde für 10 sec bei 13000 Upm abzentrifugiert. Zur Lyse und Denaturierung wurde das Pellet in 300 µl einer frisch angesetzten TENS-Lösung (0,1 N NaOH, 0,5 % SDS in TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,9)) resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl einer 3 M Na-Acetatlösung (pH 5,2) konnten die ausgefallenen Proteine, Zelltrümmer sowie die Bakterien-DNA durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 Upm von der kleineren Plasmid-DNA getrennt werden. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 900 µl kaltem Ethanol abs. gefällt und anschließend erneut für 2 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde dann mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-40 µl TE/RNase A (20 µg RNase/ml TE) aufgenommen.

Für Sequenzanalysen wurden saubere Schnellpräparationen mit Hilfe des BioRad „Miniprep-Kits“ nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte in 10 mM Tris/HCl (pH 7,5).

- Präparation großer Plasmidmengen

Zur Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA wurden QIAGEN (Hilden) „Midi- bzw. Maxi-Kits“ nach Herstelleranleitung verwendet. Die DNA wurde anschließend in 10 mM Tris/HCl resuspendiert.

2.1.2 Präparation viraler DNA

Die virushaltigen Zell-Überstände der in dieser Arbeit verwendeten HSV-1 Stämme ANGpath, 17 und KOS wurden freundlicherweise von Frau Dr. Eis-Hübinger (Virologie,

Uniklinik Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung der viralen DNA erfolgte mit Hilfe des DNeasyTM tissue-kit von QIAGEN entsprechend der Herstelleranleitung.

Die Glykoprotein B-Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten HSV-1 Stämme finden sich im Anhang. Nähere Angaben sind in der Gendatenbank enthalten:

KOS accession number K01760; ANGpath accession number U49121; Stamm 17 accession number D10879

2.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

Für die Elution der DNA-Fragmente aus TAE-Agarosegelen (40 mM Tris, 10 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7,8) wurden im Laufe dieser Arbeit zwei verschiedene Kits verwendet:

- *Elution der DNA mit dem QIAEX DNA gel extraction kit von QIAGEN*

Das Prinzip dieser Methode ist die Bindung der DNA an Silicagelpartikel. Die Elution der DNA erfolgte in 10 mM Tris/HCl.

- *Elution der DNA mit dem GENE CLEANTM Kit von MoBio Lab. (USA)*

Hierbei wird die DNA unter hohen Salzkonzentrationen an eine Glasmilchsuspension gebunden und anschließend mit H₂O oder 10 mM Tris/HCl eluiert.

2.1.4 Modifikation von DNA-Fragmenten

- *Restriktionsverdau von DNA*

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen NEB (USA), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Eurogentec (Belgien) und Roche Diagnostik (Mannheim) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Nähere Angaben über die Klonierungsstrategien der einzelnen DNA-Konstrukte finden sich in den Abschnitten 2.1.5 bzw. 2.1.6 sowie in den entsprechenden Ergebnisteilen.

- *Ligation*

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgte durch die T4-DNA-Ligase von NEB. 10-20 ng geschnittenen Vektors wurden mit einem 5-10 fachen molaren Überschuss des zu inserierenden Fragments versetzt und 1-2 h bei RT oder ü.N. bei 16 °C inkubiert. Bei der Oligonukleotidklonierung wurden für die Ligation zwischen 100-300 pmol der jeweiligen Einzelstrang-DNAs eingesetzt.

- *Dephosphorylierung der 5'-Enden linearer DNA*

Um die Wahrscheinlichkeit der Religation eines linearisierten Vektors zu verringern und die Effizienz der gewünschten Insertion einer Fremd-DNA zu erhöhen, wurde die

endständige 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors entfernt. Hierzu wurden 100-200 ng DNA mit 1 U alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostik) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym konnte anschließend durch Hitzedenaturierung inaktiviert werden.

- Phosphorylierung der 5'-Enden von Oligonukleotiden

Für die Klonierung von Oligonukleotiden mit nicht phosphorylierten 5'-Enden in dephosphorylierte Vektoren wurde unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas) die γ -Phosphatgruppe von ATP auf die freien 5'-Hydroxylgruppen der Oligonukleotide übertragen. Die Reaktion erfolgte nach Herstelleranleitung in den mitgelieferten Puffern.

2.1.5 Klonierung von Oligonukleotiden

Für die Konstruktion der Ii-Mutanten sowie der chimären Ii/gB-Konstrukte wurde mit Oligonukleotidklonierung gearbeitet. Das hierbei verwendete Ausgangskonstrukt Ii Δ 81-127aa (Mutante der genomischen Maus-Ii mit einer Deletion der bp 4717-5733; Schenk 1991) besitzt drei *HindIII*-Schnittstellen. Deshalb wurde ein *SacII/KpnI*-Fragment dieser Ii-Mutanten mit der für die nachfolgende Oligoinserterion wichtigen *HindIII*-Schnittstelle in den Zwischenvektor pGEM-7(+) (Promega, Heidelberg) subkloniert.

Für die Klonierung doppelsträngiger Oligonukleotide wurden jeweils zwei Einzelstrang-DNAs von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg), Sigma-Aldrich/Ark oder Metabion (Martinsried) bezogen. Die Oligonukleotide wurden an ihrem 5'-Ende phosphoryliert, anschließend für 10 min bei 70 °C hybridisiert und mit dem dephosphorylierten Zwischenvektor ligiert. Alle Oligonukleotide besaßen nach ihrer Hybridisierung *HindIII*-Schnittstellen an den 5' und 3'-Enden, über die sie dann mit dem Ii-Fragment ligiert werden konnten.

Folgende Oligonukleotidsequenzen wurden verwendet; sie kodieren für die darunter geschriebene Peptidsequenz:

- für die Konstruktion von Ii Δ 90-127:

```

5'   AG CTT CCG AAA TCT GCC AAA CCT GTG AGC CAG A
      3'
3'   A GGC TTT AGA CGG TTT GGA CAC TCG GTC TTC GA
      5'

      P   K   S   A   K   P   V   S   Q   K

```

- für die Konstruktion von IiΔ90-127 (K82A):

```

5'   AG CTT CCG GCT TCT GCC AAA CCT GTG AGC CAG A
      3'
3'   A GGC CGA AGA CGG TTT GGA CAC TCG GTC TTC GA
      5'

      P   A   S   A   K   P   V   S   Q   K

```

- für die Konstruktion von IiΔ90-127 (P86A):

```

5'   AG CTT CCG AAA TCT GCC AAA GCT GTG AGC CAG A
      3'
3'   A GGC TTT AGA CGG TTT CGA CAC TCG GTC TTC GA
      5'

      P   K   S   A   K   A   V   S   Q   K

```

- für die Konstruktion von IiΔ90-127 (K82L/K85L):

```

5'   AG CTT CCG CTG TCT GCC CTG CCT GTG AGC CAG A
      3'
3'   A GGC GAC AGA CGG GAC GGA CAC TCG GTC TTC GA
      5'

      P   L   S   A   L   P   V   S   Q   K

```

- für die Konstruktion von IiΔ90-127 (P81L/P86L):

```

5'   AG CTT CTG AAA TCT GCC AAA CTG GTG AGC CAG A
      3'
3'   A GAC TTT AGA CGG TTT GAC CAC TCG GTC TTC GA
      5'

      L   K   S   A   K   L   V   S   Q   K

```

- für die Konstruktion von Li/gB:

```

5'   AG CTT CCG AAA CCC CCA AAG CCG CCG CGC CCC GCC GGC
3'           A GGC TTT GGG GGT TTC GGC GGC GCG GGG CGG CCG

          P   K   P   P   K   P   P   R   P   A   G

          GAC AAC GCG ACC GTC GCC GCG A           3'
          CTG TTG CGC TGG CAG CGG CGC TTC GA        5'

          D   N   A   T   V   A   A   K

```

- für die Konstruktion von Li/gBmut:

```

5'   AG CTT CCG CTG CCC CCA CTG CCG CCG CGC CCC GCC GGC
3'           A GGC GAC GGG GGT GAC GGC GGC GCG GGG CGG CCG

          P   L   P   P   L   P   P   R   P   A   G

          GAC AAC GCG ACC GTC GCC GCG A           3'
          CTG TTG CGC TGG CAG CGG CGC TTC GA        5'

          D   N   A   T   V   A   A   K

```

- für die Konstruktion von Li/gB_{NT}:

```

5'   AG CTT CCG AAA AAC CCA ACG CCG CCG CGC CCC GCC GGC
3'           A GGC TTT TTG GGT TGC GGC GGC GCG GGG CGG CCG

          P   K   N   P   T   P   P   R   P   A   G

          GAC AAC GCG ACC GTC GCC GCG A           3'
          CTG TTG CGC TGG CAG CGG CGC TTC GA        5'

          D   N   A   T   V   A   A   K

```

Die in dieser Arbeit verwendeten Li-Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pcEXV-3 (Miller und Germain, 1986) kloniert, der über einen SV 40-Promotor verfügt. Die Aminosäuresequenzen der rekombinanten und chimären Li-Proteine finden sich im Anhang.

2.1.6 PCR und Mutagenese

- Amplifizierung der gesamten Glykoprotein B-DNA

Die für das HSV-1 Glykoprotein B (gB) codierende DNA (2,7 kb) konnte direkt aus der isolierten Virus-DNA der einzelnen HSV-Stämme amplifiziert werden. Hierzu wurde das ExpandTM Long Template PCR System von Roche Diagnostik verwendet, das mit einem Enzymmix aus thermostabiler Taq- und Pwo-Polymerase arbeitet.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

Mix 1:

- 2,5 µl dATP [10 mM]
- 2,5 µl dCTP [10 mM]
- 2,5 µl dGTP [10 mM]
- 2,5 µl dTTP [10 mM]
- 1,5 µl Vorwärtsprimer [10 µM]
- 1,5 µl Rückwärtsprimer [10 µM]
- 0,75 µl DMSO
- 6,25 µl Template-DNA
- ad 25 µl Wasser

Mix 2:

- 5,0 µl Puffer 3
- 0,75 µl Enzymmix
- ad 25 µl Wasser

Nach Vermischung der beiden Mixansätze lief die PCR mit nachfolgendem Programm:

1.	95 °C	3 min	
2.	95 °C	10 sec] 10 x
3.	50 °C	30 sec	
4.	68 °C	3 min + 20 sec dt	
5.	95 °C	10 sec] 15 x
6.	50 °C	30 sec	
7.	68 °C	3 min	
8.	68 °C	7 min	

Die verwendeten Primer enthalten *XhoI*- und *BamHI*-Schnittstellen (unterstrichener Bereich), die für die spätere Klonierung des gB-Inserts in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(-)Myc/HisA von Invitrogen (Niederlande) benötigt wurden.

Vorwärtsprimer für gB ANGpath und gB 17:

5' CCG CTC GAG CCC GCC ATG CGC CAG GGC 3'

Vorwärtsprimer für gB KOS:

5' CCG CTC GAG CCC GCC ATG CAC CAG GGC 3'

Rückwärtsprimer für alle gB-Proteine:

5' CGC GGA TCC CAG GTC GTC CTC GTC GGC 3'

- PCR-Mutagenese des gB ANGpath

Zur Konstruktion der Deletionsmutanten gB ANGpath Δ 75-92aa und der Basensubstitutionsmutanten gB ANGpath_{NT} wurde jeweils mit Fusions-PCR gearbeitet. Man amplifiziert zwei Fragmente einer DNA in getrennten Reaktionen mit jeweils einem äußeren und einem inneren Primer, der die Mutation bzw. Deletion enthält. Die beiden inneren Primer sind zueinander komplementär. Die inneren Deletionsprimer haben an ihrem 5'-Ende eine Sequenz, die mit der Sequenz auf der anderen Seite der Fusionsstelle übereinstimmt. Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel werden äquimolare Mengen beider Fragmente in eine Fusions-PCR mit den beiden äußeren Primern eingesetzt. Diese besitzen eine *XhoI*- und eine *AgeI*-Schnittstelle (unterstrichene Region), über die später das jeweilige Fusions-PCR-Produkt in den Ausgangsvektor zurückklont werden kann.

- für die Konstruktion von gB ANGpath Δ 75-92:

1. PCR-Produkt → äußerer Primer 5' CCG CTC GAG CCC GCC ATG CGC CAG
GGC 3'

→ innerer Primer 5' GCG CAG GGT GGC GTG GCC TTT TTT GTT
CTT CTT CGG TTT CGG GTC 3' (reverser Primer)

2. PCR-Produkt → innerer Primer 5' CCG AAG AAG AAC AAA AAA GGC CAC GCC
ACC CTG CGC 3'

→ äußerer Primer 5' TCG TCC CGT ACC GGT GGA ACG CCT CCA
CCC 3' (reverser Primer)

- für die Konstruktion von gB ANGpath_{NT}:

1. PCR-Produkt → äußerer Primer 5' CCG CTC GAG CCC GCC ATG CGC CAG
GGC 3'

→ innerer Primer 5' CGG CGG CGT TGG GTT TTT CGG TTT TCT
GTT CTT 3' (reverser Primer)

2. PCR-Produkt → innerer Primer 5' AAA CCG AAA AAC CCA ACG CCG CCG CGC
CCC GCC 3'

→ äußerer Primer 5' TCG TCC CGT ACC GGT GGA ACG CCT CCA
CCC 3' (reverser Primer)

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

2,5 µl dNTP-Mix [je 5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
2,5 µl äußerer Primer [10 µM]
2,5 µl innerer Primer [10 µM]
5,0 µl 10x PCR-Puffer (MBI)
3,0 µl MgCl₂ [25 mM]
1,0 µl DMSO
1,0 µl Taq-Polymerase (MBI)
0,5 µl Pwo-Polymerase (Roche)
10 ng ANGpath-gB-DNA
ad 50 µl Wasser

Bei der Fusions-PCR enthielt der PCR-Ansatz die beiden äußeren Primer in gleicher Konzentration sowie jeweils 10 ng des 1. und 2. PCR-Produktes als Template.

Die PCR wurde mit dem nachfolgendem Programm gestartet:

1.	95 °C	5 min	
2.	95 °C	30 sec] 30 x
3.	52 °C	30 sec	
4.	72 °C	1 min	
5.	72 °C	5 min	

Bei zu geringer Ausbeute wurde das PCR-Produkt zwecks Anreicherung in den Zwischenvektor pCR[®]II-TOPO von Invitrogen kloniert. Dieser Vektor liegt bereits linearisiert mit einem 3' Thymidin-Überhang vor und hat dort kovalent eine Topoisomerase gebunden. Diese katalysiert die Ligation des Vektors mit einem PCR-Produkt, das bei Verwendung der Taq-Polymerase über einen 3' Adenin-Überhang verfügt. Die Klonierung erfolgte mit Hilfe des TOPO[™] TA Cloning Kits (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers. Das Kit enthält auch die hierfür benötigten chemisch kompetenten TOP10-Bakterien.

Die Proteinsequenzen der gB ANGpath-Mutanten finden sich im Anhang.

2.1.7 Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

- DH5 α (Hanahan, 1985)

Genotyp: F⁻, end A1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, λ ⁻, recA1, gyrA96, relA1,
 Φ 80 dlacZ Δ M15

- TOP10 (Invitrogen)

Genotyp: F⁻, mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, recA1,
deoR,
araD139 Δ (araleu)7697, galU, galK, rpsL (Str^R), endA1, nupG

Die Kultivierung der transformierten DH5 α -Bakterien erfolgte in DYT-Medium (Difco, USA) bzw. auf DYT-Agar (1,5 %) in Gegenwart von 100 μ g Ampicillin/ml.

- *Elektrotransformation*

Die für die Elektrotransformation benötigten Bakterien (DH5 α) wurden zuvor nach der Methode von Dower et al. (1988) präpariert:

1 l DYT-Medium wird mit 1/100 Volumen einer Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 bei 37 °C mit 250 Upm inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und Zentrifugation bei 4 °C (15 min bei 6000 Upm) wird das Bakterienpellet mehrmals mit kalter 1 mM Hepeslösung (pH 7) gewaschen und schließlich in 2-3 ml einer 1mM Hepes/ 10% Glycerin-Lösung resuspendiert. Aliquots à 40 μ l werden sofort mit Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot der elektrokompenten Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 0,05-1 μ g Ligations-DNA in 100 μ l ddW vermischt. Die Bakterien/DNA-Lösung wurde in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und anschließend fand die Transformation mit Hilfe eines Elektroporationsgerätes (Eurogentec) bei 2,5 kV, 40 μ F und 192 Ω statt. Zur Regeneration wurden die Bakterien mit 860 μ l DYT-Medium versetzt und für 30-45 min bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden sie auf DYT-Agarplatten mit den geeigneten Antibiotika ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

- *Hitzeschocktransformation*

Die Hitzeschocktransformation der chemisch kompetenten TOP10-Bakterien (Invitrogen) mit den TOPO-Vektor-Konstrukten fand nach Anleitung des Herstellers statt. Da der pCRII-TOPO-Vektor das Ampicillinresistenzgen trägt, konnten die transformierten Bakterien mit Ampicillin selektioniert werden.

2.1.8 Sequenzanalyse

Die mittels Oligonukleotidklonierung hergestellten Ii-Mutanten wurden mit dem T7 SequenaseTM Version 2.0-Kit von Amersham (Braunschweig) sequenziert. Das Kit basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (1977). Die Sequenzreaktion erfolgte nach Herstelleranleitung. Für die Sequenzierung des codierenden Stranges wurde ein Primer (prim2) gewählt, der etwa 30 bp vor der *HindIII*-Klonierungsstelle bindet (5' GCTGACCATCACCTCCC 3', MWG-Biotech).

Die Auftrennung der Sequenzreaktionen erfolgte in 8%igen Polyacrylamid/Harnstoffgelen, die nach der Elektrophorese in 10 % Essigsäure und 12 % Methanol fixiert, anschließend gewässert und unter Vakuum getrocknet wurden.

Alle anderen in dieser Arbeit hergestellten DNA-Konstrukte wurden von der Firma GATC (Konstanz) mit kommerziell erhältlichen Primern wie T7, SP6 oder pcDNA3.1-RP sequenziert. Für die komplette Sequenzierung der gB-DNA wurden zusätzlich gB-spezifische Primer eingesetzt:

- pgB 260-286 5' ACG CGA CCG TCG CCG CGG GCC ACG CCA 3'
- pgB 601-618 5' ATC AAC GCC AAG GGG GTC 3'
- pgB 1294-1311 5' ACG CAC ATC AAG GTG GGC 3'
- pgB 2514-2497 5' GGC CTC GTC AAA GTC GCC 3' (reverser Primer)

2.2 Zellbiologische Methoden

Suspensionszellen (3A9, CTLL-2, Jesthom, WT49, BM92) wurden in komplettem RPMI 1640 und adhären wachsende COS7-Zellen in komplettem DMEM (Glukose 4,5 g/l) bei 37°C und 7,5 % CO₂ kultiviert. Komplettes Medium enthält 5-10 % FCS (Serva, Heidelberg), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin, 1 mM Na-Pyruvat, 2 mM L-Glutamin und 50 µM 2-Mercaptoethanol. Dem Medium für COS-Zellen wurde noch 10 mM Hepes zugesetzt und das Medium der CTLL-2-Zellen enthielt zusätzlich IL-2 (2ng/ml; Sigma-Aldrich).

Die Medien und Zusätze wurden von den Firmen Sigma-Aldrich, PAA (Österreich) und BioWhittaker (Belgien) bezogen.

2.2.1 Transiente Expression rekombinanter Gene in COS7-Zellen

DNA wurde mit Hilfe von Liposomen in die COS7-Zellen (DSMZ ACC 60) transferiert. Hierzu wurde Dosper[®] (Roche Diagnostik) verwendet, eine aus kationischen Lipidmolekülen bestehende Lösung, die mit der negativ geladenen DNA Komplexe bildet. Pro Transfektion wurden 7×10^5 COS-Zellen eingesetzt, die nach einem Waschschrift in FCS-freien Medium (+ 20 mM Hepes) mit dem DNA/Dosper-Gemisch (Verhältnis 1:3) für etwa 20 min in einem Polystyrene-Röhrchen geschüttelt wurden. Pro Transfektionsansatz kamen maximal 3 µg DNA zum Einsatz. Die transfizierten COS-Zellen wurden anschließend in 3 ml Medium resuspendiert, auf 6-well Platten ausgesät und blieben dann für weitere 48 h in Kultur.

2.2.2 Proliferationstest

Die Proliferation von T-Zellen erfolgt nach Erkennung eines für die T-Zelle spezifischen Antigen-MHC-Komplexes auf einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC). CD4⁺T-Zellen werden durch Antigen-MHC II-Komplexe stimuliert und produzieren während ihrer Proliferation u.a. Interleukin-2 (IL-2). Die Proliferation kann indirekt über das Wachstum einer IL-2 abhängig wachsenden CTLL-2-Zelllinie gemessen werden. Als Maß dient der Einbau von [³H]-markiertem Thymidin in die DNA der sich teilenden CTLL-2 Zellen.

In dieser Arbeit fungierten COS7-Zellen als APCs. Dazu wurden sie u.a. mit der Maus MHC II-DNA für das IA^k-Molekül transient transfiziert. Das Hühnereilysozym (HEL-Protein) diente als Antigen. Gemessen wurde die Proliferation des 3A9 T-Zell-Hybridoms, das sehr spezifisch das HEL-Peptid 48-61 auf einem IA^k-Molekül erkennt.

24 h nach der Transfektion wurden jeweils 5×10^4 COS7-Zellen für weitere 24 h mit 10 µg/ml HEL-Protein (Sigma-Aldrich) gefüttert. Die Inkubation transfizierter COS7-Zellen mit 5 µM des HEL 48-61 Peptids (Interactiva, Ulm) erfolgte für 2 h. Nach Zugabe von 5×10^4 3A9 T-Zellen pro Ansatz wurde dieser für weitere 48 h in 500 µl komplettem RPMI kultiviert. Anschließend wurden pro Ansatz 100 µl des Überstandes mit jeweils 1×10^4 CTLL-2 Zellen in 100 µl komplettem RPMI versetzt, für 24 h kultiviert und dann für 18 h mit 1 µCi [³H]-Thymidin (Amersham) markiert. Die Ernte der CTLL-2 Zellen auf Glasfaserfilter der Firma Wallac/PerkinElmer (Belgien) erfolgte mit Hilfe eines Harvesters von der Firma Canberra Packard. Die Filter wurden anschließend mit Szintillationswachs (Wallac/PerkinElmer) überzogen und dann in einem Szintillationszähler (Wallac) gemessen.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Biosynthetische Markierung zellulärer Proteine

Für die biosynthetische Markierung von Proteinen mit [^{35}S]-Methionin (Amersham) wurden jeweils $1\text{--}2 \times 10^6$ Zellen in der Platte mit Methionin-freiem Medium (Biochrom, Berlin) gewaschen und dann für 1 h in 600 μl Pulse-Medium (Methionin-freies Medium + 10% dialysiertes FCS (PAA), 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat, 10 mM Hepes, 100 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin, 100 U/ml Streptomycin) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 40 μCi [^{35}S]-Methionin für 30-40 min bei 37 °C markiert. Nach Entnahme des Überstandes wurden die Zellen bei -20 °C gelagert oder direkt für eine Immunpräzipitation verwendet.

2.3.2 Immunpräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist die Isolierung eines spezifischen Proteins aus einem Proteingemisch möglich. Dazu werden Antikörper verwendet, die über ihre variable Region eine Determinante des spezifischen Proteins erkennen und mit ihrer konstanten Region –direkt oder über einen Sekundärantikörper- an Protein A-Sepharose binden. Durch Zentrifugation kann der große Protein A-Immunkomplex pelletiert werden.

Die Lyse der Zellen erfolgte in 500 μl kaltem Lysispuffer (TBS: 50 mM Tris/HCl pH 7,5 + 150 mM NaCl, versetzt mit den Proteaseinhibitoren Aprotinin [0,1 mM] + PMSF [0,1 mM] und dem Detergenz NP-40 (1%)). Die Zelltrümmer wurden für 3 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Unspezifisch an Sepharose-bindende Proteine wurden aus dem Lysat über eine Vorpräzipitation mit CL4B-Sepharose (Pharmacia, Schweden) entfernt. Der aufgereinigte Überstand routierte 4-24 h mit dem spezifischen Antikörper (s. **Tab.1**) und 10 μl der Protein A-Sepharose (Pharmacia) bei 4 °C. Der Sepharose-Immunkomplex konnte mittels Zentrifugation (13000 Upm für 30 sec) pelletiert werden. Anschließend wurde der Komplex 3x mit jeweils 500 μl TBS (+ 0,25% NP-40, 0,1 mM PMSF, 0,1 mM Aprotinin) gewaschen. Durch Aufnahme des Präzipitats in 20-30 μl reduzierenden Probenpuffers (62,5 mM Tris/HCl, 50 mM DTT, 10% Glycerin, 2,3% SDS, 0,01% Bromphenolblau) und Erhitzen (5 min bei 95 °C) konnten die Bindungen innerhalb des Sepharose-Immunkomplexes zerstört und die Proteine denaturiert werden. Um SDS-stabile Komplexe zu erhalten, wurden die Proben in 20-30 μl nicht-reduzierendem Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl, 10% Glycerin, 2,3% SDS, 0,01% Bromphenolblau) aufgenommen

und nicht erhitzt. Die Auftrennung der isolierten Proteine erfolgte anschließend über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Die in der Immunpräzipitation verwendeten Antikörper aus Hybridomüberständen wurden 1-fach konzentriert eingesetzt und der aufgereinigte monoklonale Antikörper Anti-His (C-term) von Invitrogen in einer Verdünnung von 1:250.

Antikörper	Spezifität	Art des Antikörpers	Referenz
In-1	Maus Ii, N-Terminus	mAb, Ratte, IgG2a	Koch et al., 1982a
MAR 18.5	Ratten IgG	mAb, Maus, IgG2a	Lanier et al., 1982
ISCR3	HLA-DR	mAb, Maus, IgG2a	Watanabe et al., 1983
I 251 SB	HLA-DR	mAb	Pesando und Graf, 1986
10.2-16	H2-IA β -Kette des Haplotypes k,f,r,s,u	mAb, Ratte, IgG2b	Oi et al., 1987
Anti-His (C-term)	6x His-COOH	mAb, Maus, IgG2b	Invitrogen

Tab. 1 Zur Immunpräzipitation verwendete Antikörper

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einem elektrischen Feld wird durch die Gesamtladung der Proteine sowie deren Größe bestimmt. Mit Hilfe dieses Verfahrens ist eine Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht und unabhängig von ihrer Eigenladung möglich. Die in reduzierendem Probenpuffer aufgenommenen Proteine werden durch das darin enthaltene Detergenz SDS denaturiert. Negativ geladene SDS-Moleküle binden an die hydrophoben Regionen der Proteine proportional zu deren Molekulargewicht, wodurch die Eigenladung der Proteine überdeckt wird. Inter- und intramolekulare Disulfidbrücken werden durch das ebenfalls im Probenpuffer enthaltene DTT reduziert.

Zwecks Fokussierung durchlaufen die SDS-Protein-Komplexe bei der Elektrophorese zunächst ein großporiges Sammelgel mit geringem Polyacrylamidanteil. Anschließend erfolgt die Auftrennung der Komplexe in einem höherprozentigem Trenngel mit geringer Porengröße.

Zur Herstellung der SDS-Gele wurde das Acrylamid-Puffersystem von BioRad mit einer 30%-igen Acryl/Bisacrylamidlösung (Verhältnis 37,5:1) verwendet. Die aufzutrennenden Proteine durchliefen ein 4 % iges Sammelgel und anschließend ein 12 % iges Trenngel.

- *Fluorographie (Bonner und Laskey, 1974)*

PPO bewirkt eine Verstärkung der im Gel gebundenen Radioaktivität. Zwecks PPO-Einlagerung müssen die Gele zunächst entwässert werden. Beim nachfolgenden Wässern des Gels fällt das eingelagerte PPO aus und verbleibt im Gel.

Nach dem Lauf wurden die Trenngele für 30 min in DMSO entwässert und anschließend für 30 min in 20% PPO/DMSO geschüttelt. Im darauffolgendem Wässerungsschritt (30 min schütteln) konnte das überflüssige DMSO entfernt werden. Die Gele wurden dann unter Vakuum getrocknet.

2.3.4 Behandlung immunpräzipitierter Glykoproteine mit Endoglykosidase H

Viele Proteine werden nach ihrer Synthese intrazellulär modifiziert. Eine dieser posttranslationalen Modifikationen ist die Anhängung N-gebundener Zuckerreste im ER. Gelangen diese Proteine anschließend in den Golgi-Apparat erfahren die Zuckerseitenketten weitere Modifikationen. Endoglykosidase H (Endo H) spaltet vorwiegend N-gebundene Zuckerreste von Proteinen ab. Sobald diese Zuckerreste jedoch weiter modifiziert werden, sind sie gegen einen Endo H Verdau resistent. Lediglich die Proteine im ER sind sensitiv gegenüber Endo H, was sich nach einem Verdau durch eine Größenabnahme von ca. 2,5-3 kDa pro N-gebundenem Zuckerrest zeigt.

Für den Endo H Verdau wurden die immunpräzipitierten Proteine in je 10µl Puffer (100 mM Tris/HCl (pH 7,2), 10 mM EDTA (pH 7,0), 0,5 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) aufgenommen und mit 5 mU Endoglykosidase H (Roche Diagnostik) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und dann in einer SDS-PAGE analysiert.

2.3.5 Tunicamycin Behandlung von transfizierten COS7-Zellen

Tunicamycin blockiert die Anhängung N-gebundener Zuckerreste an Proteine im ER und verhindert somit auch weitere Modifikationen der Zuckerseitenketten im Golgi-Apparat. Um zwischen glykosylierten und deglykosylierten Formen eines Glykoproteins unterscheiden zu können, wurden die Zellen 3-4 Stunden vor und während der

radioaktiven Markierung mit 50µg/ml Tunicamycin (Roche Diagnostik) bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Immunpräzipitation erfolgte eine Analyse der deglykosylierten Proteine in einer SDS-PAGE.

2.3.6 Durchfluscytometrie

Mit Hilfe eines Durchfluscytometers (FACS: fluorescence-activated cell sorter) können Zellen nach einer Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern analysiert werden. Dazu werden die Zellen zunächst hydrodynamisch fokussiert, damit sie einzeln einen Messpunkt passieren können. Dort wird der Zellstrom von einem Argon-Laser bestrahlt, der Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm emittiert. An die Zelle gebundene Fluoreszenzfarbstoffe werden durch die Laser-Bestrahlung angeregt und emittieren ein Fluoreszenzlicht charakteristischer Wellenlänge. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe mit jeweils unterschiedlichem Fluoreszenzmaximum können gleichzeitig verwendet werden. Im FACS werden sowohl die emittierten Fluoreszenzen als auch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht der einzelnen Zellen von verschiedenen Detektoren gemessen.

- MHC II-Oberflächenbeladung mit biotinylierten Peptiden

Für diese Peptidbindungsstudie wurden die humanen B-Lymphome Jesthom (DR1), WT49 (DR3) und BM92 (DR4) verwendet. Sie exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine große Anzahl definierter HLA-DR Moleküle (s.o.). Die jeweils am N-Terminus biotinylierten Peptide wurden von den Firmen Interactiva (Ulm) bzw. Sigma-Aldrich/Genosys (Großbritannien) synthetisiert und mit Hilfe eines Streptavidin-FITC Antikörpers nachgewiesen.

Folgende Peptide wurden verwendet:

HSV _k (81-95aa)	Biotin-PRPAGDNATVAAGHA-COOH	
HSV (75-95aa)	Biotin-PKPPKPPRPAGDNATVAAGHA-COOH	
HSV _{mut} (75-95aa)	Biotin-PLPPLPPRPAGDNATVAAGHA-COOH	
MAT _A (17-31aa)	Biotin-SGPLKAEIAQRLEDV-COOH	(Kontrolle für DR1)
MAT _T (17-31aa)	Biotin-SGPLKAEITQRLEDV-COOH	(Kontrolle für DR4)
Momp	Biotin-QASLALSYRLNMFTPKL-COOH	(Kontrolle für DR3)

Die HSV- Peptide entstammen aus dem HSV-1 gB (Stamm 17). Momp ist ein antigenes Peptid aus einem Hauptprotein von *Chlamydia trachomatis*, das in die Antigen-bindende

Grube von HLA-DR3 bindet (Riberdy et al. 1992; Mellins et al. 1994). MAT ist ein Peptid aus dem Influenzavirus Matrixprotein. Der Austausch einer Aminosäure (aa 25) im Peptid führt zu einem veränderten Bindungsverhalten. Während MAT_A mit hoher Affinität an HLA-DR1 bindet (Marshall et al. 1994), zeigt MAT_T eine starke Assoziation zu HLA-DR4 (Hammer et al. 1993).

Je $1-2 \times 10^5$ Zellen wurden ü.N. mit 150-200 μM des jeweiligen Peptids bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschschrte in FACS-Puffer ($\text{PBS}^- + 0,1\% \text{NaN}_3 + 5-10\% \text{FCS}$). Dann wurden die Zellen für 40 min bei 4 °C mit einem Streptavidin-FITC Antikörper (Pharmingen 13024D) im Dunkeln inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in FACS-Puffer eingesetzt. Nach 2 weiteren Waschschrten erfolgte zur Signalverstärkung eine 40 minütige Inkubation mit einem biotinyliertem anti-Streptavidin Antikörper (Vector Laboratorys, BA 0500) in einer Verdünnung von 1:100. Anschließend wurde wieder 2x gewaschen und dann folgte erneut eine Inkubation mit dem Streptavidin-FITC Antikörper unter vorherigen Bedingungen. Zur direkten HLA-DR-Färbung wurden die Zellen unter gleichen Inkubationsbedingungen mit einem HLA-DR-PE Antikörper (Pharmingen) in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Nach einem letzten Waschschrte konnten die Zellen dann in FACS-Puffer resuspendiert und im FACS analysiert werden.

2.3.7 Oberflächenbiotinylierung von transfizierten COS7-Zellen

Je 1×10^6 transfizierte COS7-Zellen (nicht abtrypsinisiert) wurden 2x mit kaltem PBS^- gewaschen. Anschließend erfolgte die Resuspension der Zellen in 1 ml Biotinylierungspuffer (4,15 ml 300 mM Na-Boratpuffer (pH 8,0), 3,75 ml 1 M NaCl ad 25 ml ddw) und die Zugabe von 10 μl frisch angesetzter Biotin-7-NHS-Stammlösung (10mg/ml) (Sigma-Aldrich). Die Zellen wurden dann für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe von je 20 μl Stop-Lösung (100 mM NH_4Cl) wurde die Biotinylierung der auf der Zelloberfläche exprimierten Proteine beendet. Die Zellen wurden auch diesmal für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert und dann 2x mit kaltem PBS^- gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und nach einer Immunpräzipitation erfolgte die Auftrennung der biotinylierten Proteine in einer SDS-PAGE. Die Proteine konnten dann in einem Western blot nachgewiesen werden.

- Westernblot

Die Proteine im SDS-Gel wurden auf eine PVDF-Membran geblottet (5-8 V für ca. 45 min). Die PVDF-Membran wurde anschließend in Blotpuffer (0,25 % Tween 20 in PBS⁻) gewaschen und für 1 h mit Rotiblock (Roth) abgesättigt. Dann wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem anti-Biotin/HRP gekoppeltem Antikörper (1:14000) inkubiert und nach mehreren Waschschritten mit Blotpuffer konnten die biotinylierten Proteine durch Zugabe einer Chemilumineszenz-Lösung (ECL; Amersham) und Auflegen eines Röntgenfilms nachgewiesen werden.

2.4 Verwendete Computersoftware und Datenbanken

Textverarbeitung:	Microsoft Word 2000 Microsoft Corporation
Tabellenkalkulation:	Microsoft Excel 2000 Microsoft Corporation
Schematische Darstellungen:	CorelDRAW 8 Corel Corporation
	WinMDI 2.8 Joseph Trotter
	Microsoft PowerPoint 2000 Microsoft Corporation
Scannen und densitometrische Auswertung:	Agfa Fotolook 3.03
	Adobe Photoshop 4 Adobe Systems
	NIH Image 1.61
Sequenzalignment:	Genedoc
Datenbanken:	NCBI Homepage: www.ncbi.nlm.nih.gov/ SYFPEITHI: www.bmi-heidelberg.com/syfpeithi Sequenzvergleich: www.ebi.ac.uk/searches/blitz.html

3. Ergebnisse

3.1 HSV-1 Glykoprotein B (gB) enthält eine Sequenz mit Homologie zur MHC Klasse II-Bindungsstelle der Invarianten Kette (Ii)

Die Assoziation zwischen der Ii und MHC Klasse II-Molekülen findet vor allem über die Klasse II-Bindungsstelle der Ii statt. Diese Region lässt sich in zwei funktionelle Bereiche unterteilen. Der Klasse II Grube-bindende Bereich vermittelt Allel-spezifische Bindung an Klasse II-Moleküle, wohingegen die promiskuitive Bindungsstelle für die Assoziation mit verschiedenen Klasse II-Alлотypen verantwortlich ist (Freisewinkel, 1995).

Mit Hilfe der Datenbankrecherche (www2.ebi.ac.uk/bic_sw) konnte eine zur promiskuitiven Bindungsstelle der Ii identische Sequenz innerhalb des viralen Glykoprotein B (gB) vom HSV-1 Stamm 17 gefunden werden (**Abb.1**). Hinter der identischen Sequenz folgt im gB eine Region mit einem Bindungsmotiv für MHC Klasse II-Moleküle. Der potentiell Klasse II-bindende Bereich von gB enthält neben einem hoch bewerteten Bindungsmotiv für HLA-DR1 auch ein geringer bewertetes Motiv für HLA-DR4 und für das Maus Klasse II-Molekül IA^k. Die Sequenz der Bindungsmotive wurden nach einem Algorithmus („MHC Ligands and Peptide Motifs“, H.G. Rammensee) ermittelt.

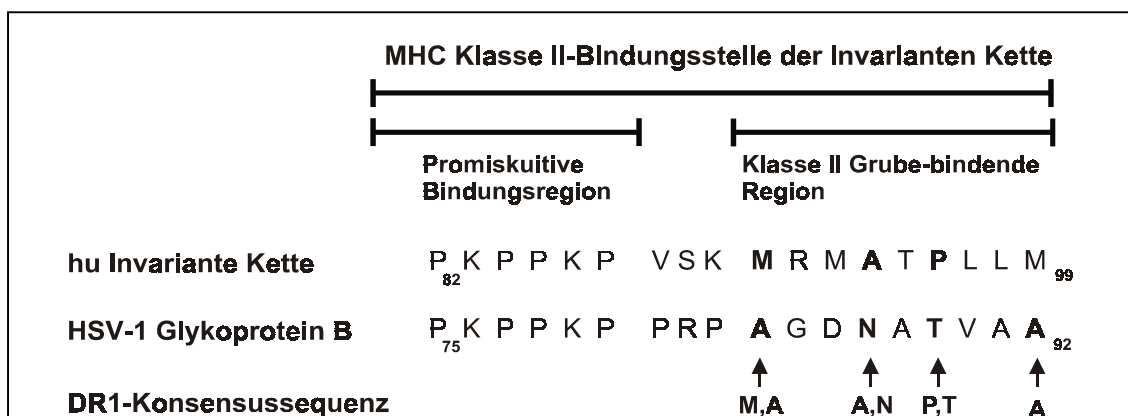


Abb.1 MHC Klasse II-Bindungsmotive der Invarianten Kette und von HSV-1 Glykoprotein B

Die Bindungsstelle der Ii für MHC Klasse II-Moleküle kann in zwei Regionen unterteilt werden, die durch 3 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Der Grube-bindende Bereich vermittelt eine Allel-spezifische Bindung an MHC Klasse II-Moleküle, wohingegen die promiskuitive Bindungsstelle für die Assoziation mit verschiedenen Klasse II Allo- und Isotypen verantwortlich ist. Das virale Glykoprotein B des Herpes simplex Virus (Stamm 17) besitzt eine identische Sequenz zur promiskuitiven Bindungssequenz der humanen Ii, sowie ein Bindungsmotiv für HLA-DR1 Moleküle. Die für eine Bindung wichtigen Ankerpositionen sind mit einem Pfeil markiert, mit der Konsensussequenz übereinstimmende Aminosäuren sind fett gedruckt. Die Zahlen an einzelnen Aminosäuren geben deren Position im Protein an.

Das Klasse II-Bindungsmotiv von gB wurde mit Hilfe der Datenbank „SYFPEITHI“ (www.uni-tuebingen.de) auf seine potentiellen Bindungseigenschaften gegenüber verschiedenen Klasse II-Molekülen geprüft. Die Datenbank bewertet die Bindungseigenschaften der einzelnen Aminosäuren gegenüber den Ankerpositionen der jeweiligen MHC Klasse II-Peptidbindungsgrube und kalkuliert daraus einen „score“ für dieses Epitop. Nach Eingabe der gB-Sequenz (A₈₄GDNATVAAGHATLR₉₈) mit dem potentiellen Klasse II-Bindungsmotiv ergab sich für HLA-DR1 Moleküle ein score von 22, für HLA-DR4 ein score von 12 und für Maus-IA^k ein score von 20. Für HLA-DR3 Moleküle findet sich kein Bindungsmotiv, wenn von der gleichen Position innerhalb der Sequenz ausgegangen wird. Verschiebungen um eine Aminosäure resultieren in einem Bindungsmotiv für HLA-DR3 Moleküle mit einem sehr geringen score von 2.

3.2 Bindung von HSV-1 gB an verschiedene MHC II-Allotypen

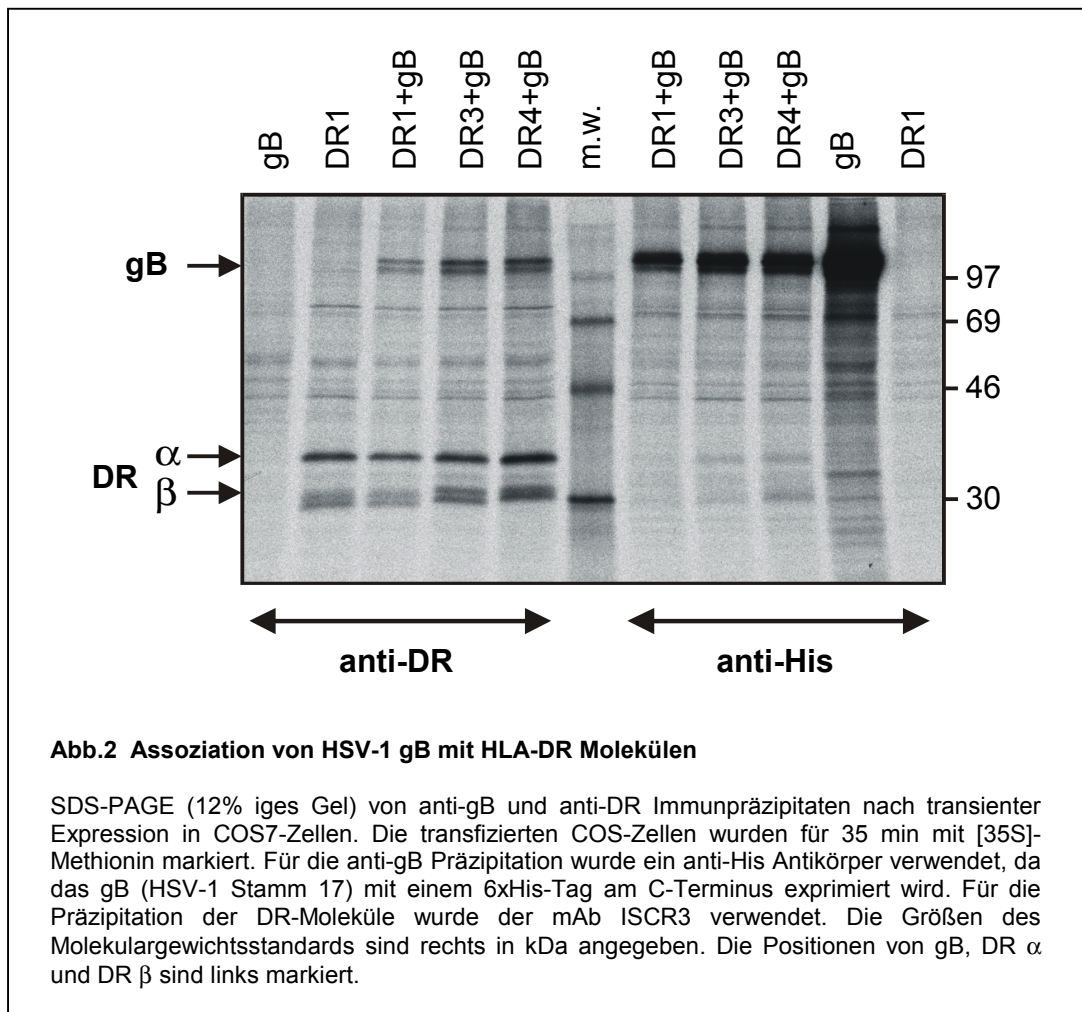
Da das virale gB eine potentielle Klasse II-Bindungsstelle besitzt, sollte durch Koexpression von gB mit verschiedenen HLA-DR Allotypen deren Assoziation zueinander getestet werden. Die verwendeten humanen MHC Klasse II HLA-DR cDNAs befinden sich in dem pcEXV3-Vektor unter Kontrolle eines SV-40 Promotors. Die HSV-1 gB cDNA wurde mittels PCR aus isolierter Virus-DNA von Stamm 17 amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-)Myc/HisA kloniert. Dieser Vektor kontrolliert die Expression der gB-DNA über seinen CMV-Promotor und hängt außerdem eine 6xHis-Sequenz an. Das exprimierte gB besitzt einen His-Tag am C-Terminus, über den es mit Hilfe eines Anti-His Antikörpers isoliert werden kann.

Für die Koexpression wurden COS7-Zellen mit DR- und gB-DNA transfiziert. Anschließend erfolgte eine biosynthetische Markierung der Zellen mit [³⁵S]-Methionin. Nach Lyse der markierten Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit dem anti-DR Antikörper (ISCR3) und dem anti-His (C-term) Antikörper durchgeführt. Die Auftrennung der Immunpräzipitate erfolgte anschließend in einer SDS-PAGE.

Wie in **Abb.2** zu sehen ist, assoziiert gB mit den drei getesteten HLA-DR Allotypen. gB hat nach Abspaltung einer N-terminalen Signalsequenz von 30 Aminosäuren (aa) eine Länge von 874 aa. Das vollständig glykosylierte gB besitzt ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa. Im SDS-Gel tritt gB als Doppelbande auf, die wahrscheinlich durch unterschiedliche Glykosylierungsformen zustande kommt. Die Kopräzipitation der DR-Moleküle über den anti-His Antikörper ist bedeutend schwächer, da die DR α - und DR β -

Kette lediglich über 3 bzw. 2 Methioninreste verfügen im Gegensatz zu gB mit 22 Methioninresten. Möglicherweise ist jedoch auch eine Überexpression von gB für dieses Phänomen verantwortlich.

Die Spezifität der Banden wurde durch Einzeltransfektionen der COS7-Zellen mit gB bzw. DR1 überprüft.



3.3 Identifizierung der für die Assoziation wichtigen Aminosäuren innerhalb der promiskuitiven Bindungsstelle (PBS) der Ii

Eine Ii-Deletionsmutante, der die MHC Klasse II-Bindungssequenz fehlt, kann nicht mehr mit MHC Klasse II-Molekülen assoziieren. Wird jedoch die promiskuitive Bindungsstelle (PBS) wieder eingefügt, findet auch wieder eine Assoziation mit Klasse II-Molekülen statt (Freisewinkel, 1995). Die Klasse II-Bindungssequenz der Ii zeigt innerhalb verschiedener Säugerspezies große Homologien (**Tab.2**).

Mensch Ii	...P ₈₂	K	P	P	K	P	V	S	K	M	R	M	A	T	P	L	L	M ₉₉ ...
Maus Ii	...P ₈₁	K	S	A	K	P	V	S	Q	M	R	M	A	T	P	L	L	M ₉₈ ...
Ratten Ii	...P ₈₂	K	S	A	K	P	V	S	P	M	R	M	A	T	P	L	L	M ₉₉ ...
Rind Ii	...P ₈₁	K	P	A	K	P	M	S	Q	M	R	M	A	T	P	M	L	M ₉₈ ...

Tab.2 Sequenzvergleich der Ii innerhalb verschiedener Säugerspezies

Die oben aufgeführte Ii-Aminosäuresequenz der verschiedenen Säuger erstreckt sich lediglich über den Bereich der MHC Klasse II-Bindungsstelle. Die promiskuitive Bindungsstelle ist rot markiert, der Klasse II Grube-bindende Bereich grün. Die Zahlen geben die jeweilige Position der Aminosäuren innerhalb des Proteins an.

(Genbank Accession Nr: Mensch Ii NM004355, Claesson et al. 1983; Maus Ii AA895577, Zhu und Jones 1989; Ratten Ii X14254, McKnight et al. 1989; Rind Ii D83962, Niimi et al. 1996)

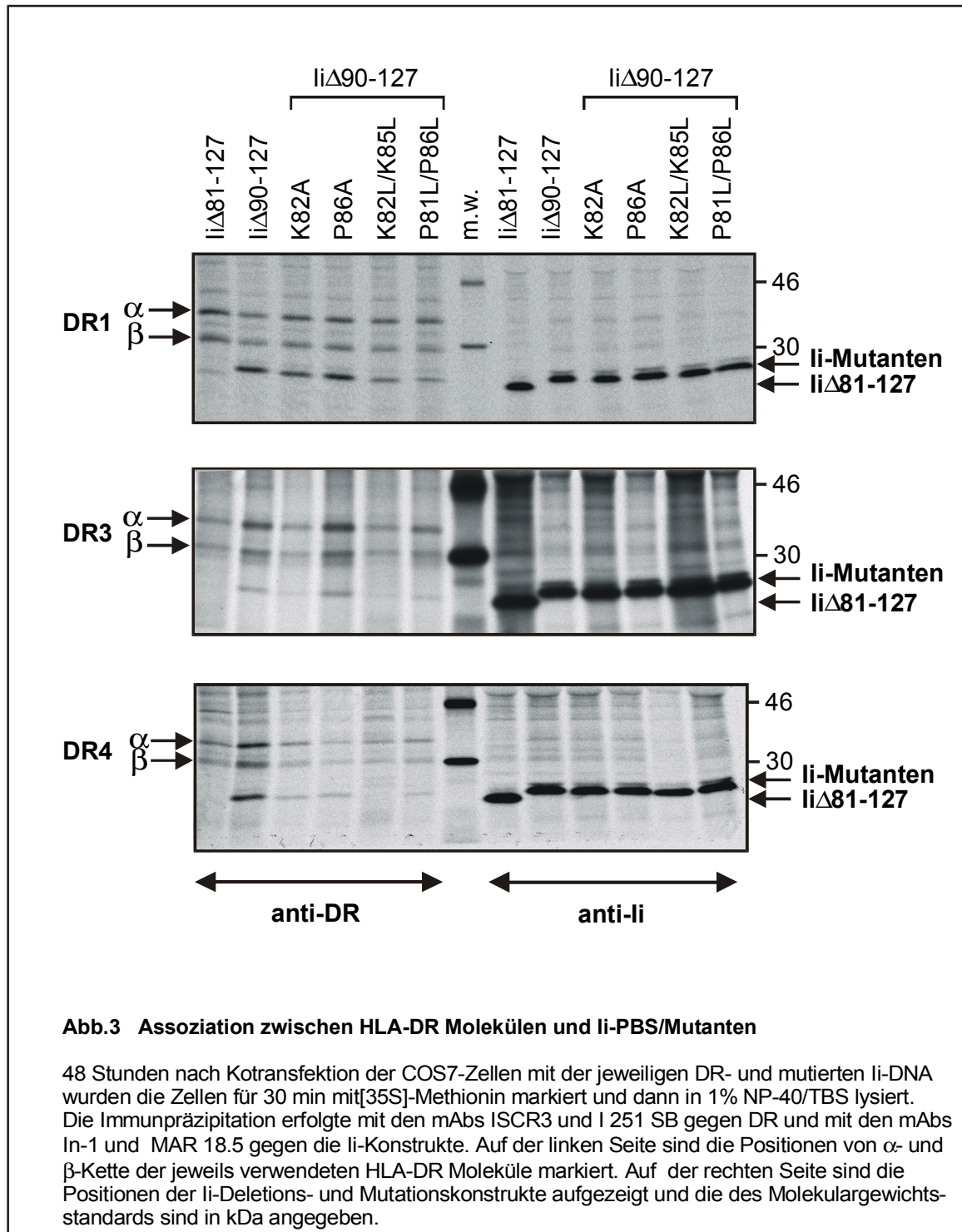
Da sich die humane Ii und die der Maus nicht in ihrem Bindungsverhalten zu humanen HLA-DR Molekülen unterscheiden, wurde mit Ii-Konstrukten der Maus gearbeitet. Um die für die Assoziation notwendigen Aminosäuren innerhalb der PBS zu identifizieren, erfolgte ein Austausch der äußeren hoch konservierten Prolin- und Lysinreste gegen Alanin- oder Leucinreste (Maus:PKSAKP; Mensch:PKPPKP), was in **Tab.3** dargestellt ist.

PBS	P81	K82	S83	A84	K85	P86	V87	S88	Q89
K82A	-----	A82	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
P86A	-----	-----	-----	-----	-----	A86	-----	-----	-----
K82L/K85L	-----	L82	-----	-----	L85	-----	-----	-----	-----
P81L/P86L	L81	-----	-----	-----	-----	L86	-----	-----	-----

Tab.3: Mutationen innerhalb der PBS-Sequenz der Maus Ii

Die hoch konservierten Proline und Lysine innerhalb der PBS (rot) wurden durch Alanin- oder Leucinreste (blau) substituiert. Die nebenstehenden Zahlen geben die jeweilige Position der Aminosäuren innerhalb des Proteins an.

Mittels Oligonukleotidklonierung wurde in das Ii-Deletionskonstrukt (Ii Δ 81-127) ohne MHC Klasse II-Bindungssequenz entweder die ursprüngliche PBS-Sequenz mit Spacer-Region (PKSAKPVSQ) eingefügt, was dem Konstrukt Ii Δ 90-127 entspricht, oder es wurden die verschieden mutierten PBS-Sequenzen (s.**Tab.3**) eingefügt. Die Proteinsequenzen der rekombinanten Ii-Proteine finden sich im Anhang. Anschließend erfolgte die Transfektion von COS7-Zellen mit DNA dieser Ii-Mutanten und verschiedenen HLA-DR cDNAs. Nach biosynthetischer [³⁵S]-Methionin Markierung und Immunpräzipitation gegen Ii und DR, konnten die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt werden. **Abb.3** zeigt die jeweiligen Kopräzipitationen mit DR1, DR3 und DR4. Die Expression der verschiedenen Ii-Mutanten ist relativ konstant, was aus den Ii-Präzipitationen deutlich wird. Trotzdem zeigen die unterschiedlichen Ii-Konstrukte in der Kopräzipitation mit DR unterschiedliche Bindungsintensitäten. Das Ii-Deletionskonstrukt ohne MHC Klasse II-Bindungsstelle (Ii Δ 81-127) assoziiert nicht mehr mit DR3 und DR4 und nur noch schwach mit DR1. Nach Einfügen der PBS-Sequenz (Ii Δ 90-127) ist jedoch wieder eine Bindung an alle drei DR-Allotypen möglich. Während die Mutationskonstrukte mit einem Aminosäureaustausch noch relativ gut an alle drei DR-Allotypen binden, zeigen die Mutationen mit zweifacher Aminosäuresubstitution ein deutlich reduziertes Bindungsverhalten zu den drei getesteten DR-Molekülen.



Um eine genauere Aussage über die verschiedenen Bindungsstärken der li-Mutanten zu HLA-DR machen zu können, wurde die Intensität der spezifischen über DR kopräzipitierten li-Banden densitometrisch gemessen. In **Tab.4** ist der li-Bindungsindex der verschiedenen li-Mutanten zu den getesteten DR-Allotypen (li/ $\alpha\beta$) dargestellt.

		liΔ90-127				
	liΔ81-127	liΔ90-127	K82A	P86A	K82L/K85L	P81L/P86L
DR1	0.05	1	0.5	0.7	0.4	0.3
DR3	0	1	0.6	1.1	0.3	0.7
DR4	0	1	0.6	0.8	0	0.2

Tab.4 li-Bindungsindex zu verschiedenen DR-Allotypen [li/αβ]

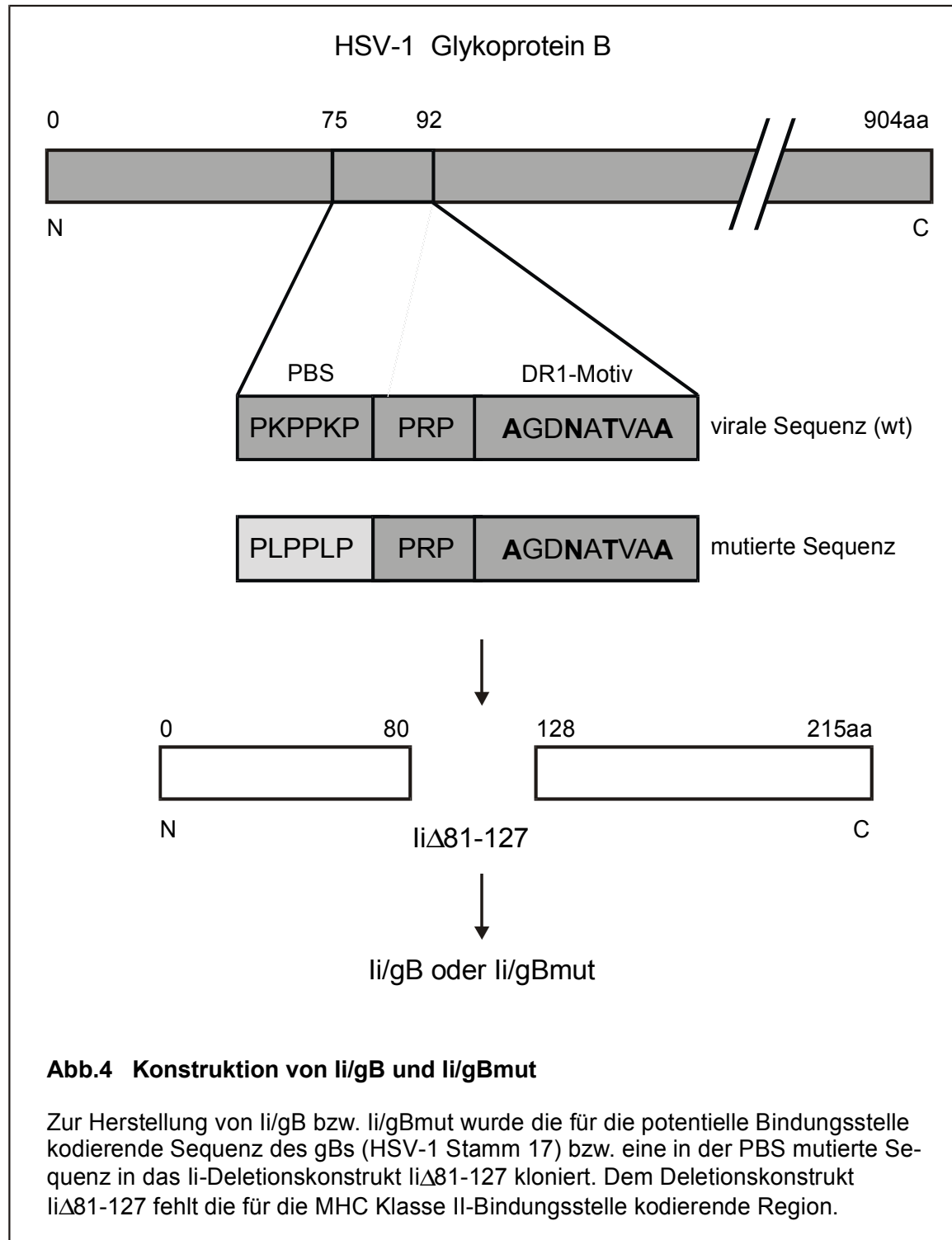
Nach Kcotransfektion der COS7-Zellen mit den jeweiligen DR- und den verschieden mutierten li-DNAs wurden die Zellen mit [35S]-Methionin für 30 min markiert, anschließend immunpräzipitiert und dann in einer SDS-PAGE (12% iges Gel) aufgetrennt. Für die Präzipitation gegen DR wurde der mAb ISCR3 verwendet und für die Isolation der li-Konstrukte wurden der mAb In-1 mit dem Brückenantikörper MAR 18.5 eingesetzt. Nach densitometrischer Bestimmung der DR- und li- Bandenintensität konnte der li-Bindungsindex der einzelnen li-Mutanten zu den verschiedenen DR-Allotypen berechnet werden. Dabei wurde die unterschiedliche Anzahl der Methionine berücksichtigt: li-Konstrukte/6 ; α-Kette/3 ; β-Kette/2 Der li-Bindungsindex berechnet sich wie folgt: 1/6 der li-Bandenintensität : 1/5 der Intensität von (α+β); der Index von liΔ90-127 wird jeweils als1 festgesetzt.

Wie aus **Tab.4** und **Abb.3** ersichtlich ist, kann die fehlende Assoziation von li Δ 81-127 zu allen drei DR-Allotypen durch Einfügen der ursprünglichen PBS-Sequenz wiederhergestellt werden. Die Substitution beider Lysinreste zu Leucin (K82L/K85L) zeigt den stärksten Effekt. Bei dieser li-Mutanten ist die Bindung zu DR1 und DR3 deutlich reduziert und die Assoziation mit DR4 verschwindet sogar. Auch die Substitution beider Prolinreste gegen Leucin bewirkt eine schwächere Bindung an alle drei DR-Allotypen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass vor allem die Lysine aber auch die äußeren Proline innerhalb der PBS-Sequenz für deren Assoziation mit Klasse II-Molekülen notwendig sind.

3.4 Beschreibung der chimären li/gB Konstruktionen

Da in dem gB eine zur PBS homologe Sequenz (PKPPKP) mit einem darauffolgenden Bindungsmotiv für MHC Klasse II-Moleküle gefunden wurde, sollte nun geklärt werden,

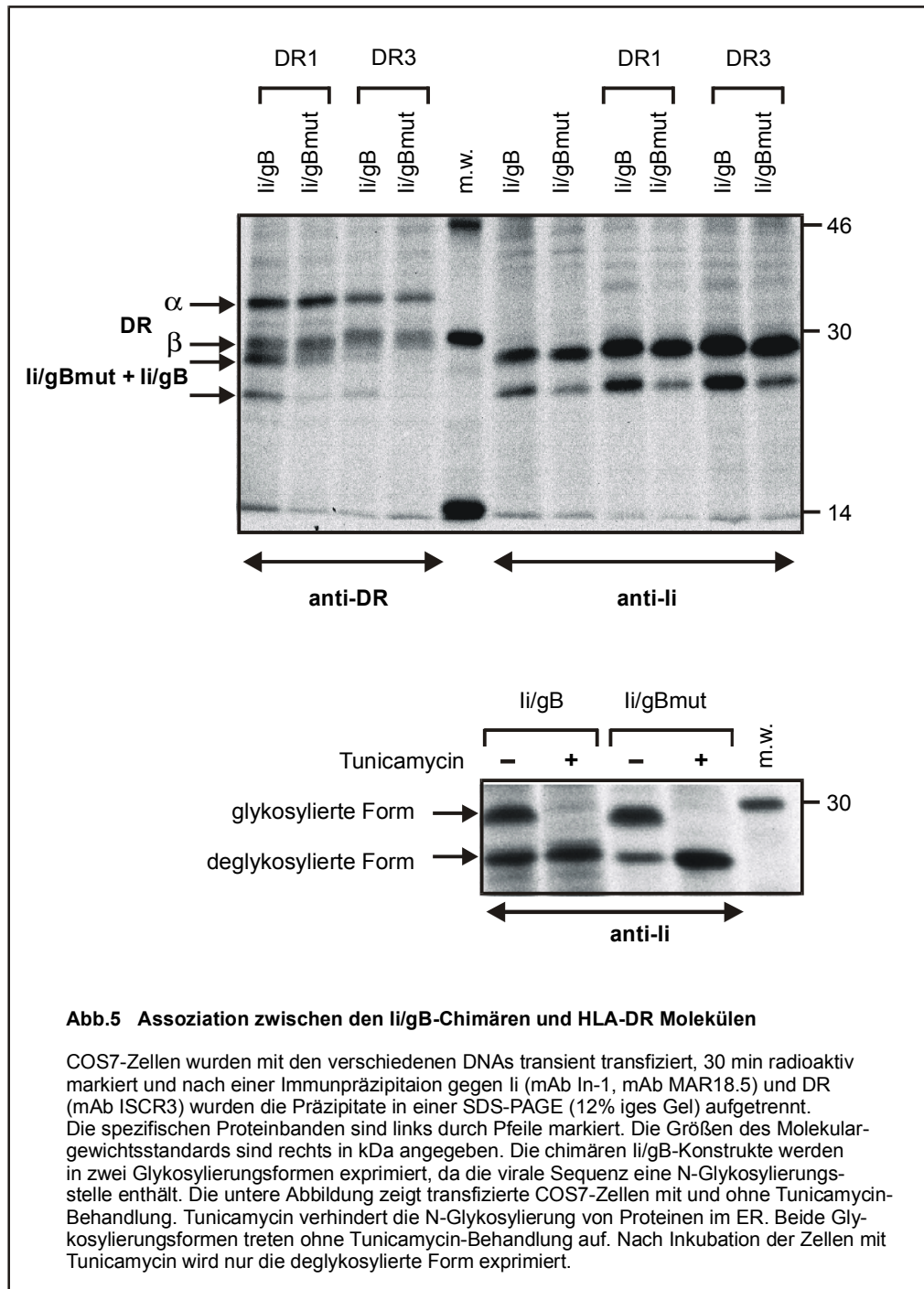
ob dieser gB-Bereich (aa 75-92) mit der potentiellen Bindungsstelle die Funktion der Ii-Bindungsstelle übernehmen kann. Deshalb wurde diese Region aus dem gB mittels Oligonukleotidklonierung in die Ii-Deletionsmutante Ii Δ 81-127 kloniert. Diese chimäre Konstruktion wird als Ii/gB bezeichnet. Mit der Herstellung des Ii/gBmut-Konstruktes, das außer dem viralen DR1-Bindungsmotiv eine mutierte, schlecht bindende PBS-Sequenz (PLPPLP s.Tab.3/ Tab.4) enthält, sollte die Funktionalität der beiden Einzelbereiche (PBS und Grube-bindende Region) untersucht werden. In **Abb.4** ist die Konstruktion der beiden Ii/gB-Chimären gezeigt.



3.5 Assoziation zwischen chimären Ii/gB-Konstrukten und DR-Molekülen

Die Bindung der Ii/gB-Chimären an Klasse II kann durch deren Koexpression mit HLA-DR Molekülen in COS7-Zellen überprüft werden. Hierzu wurden COS7-Zellen mit den DNAs für Ii/gB bzw. Ii/gBmut und DR1 bzw. DR3 transient transfiziert, anschließend

radioaktiv markiert und nach einer Immunpräzipitation gegen Ii und DR wurden die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Wie in **Abb.5** zu sehen ist, treten die chimären Ii/gB-Konstrukte als Doppelbande im SDS-Gel auf. Da das Ii-Deletionskonstrukt (Ii Δ 81-127) keine N-Glykosylierungsstellen mehr hat und nur die gB-Sequenz innerhalb des DR1-Bindungsmotives eine N-Glykosylierungsstelle besitzt, kann es sich bei der Doppelbande um verschiedene Glykosylierungsformen der Ii/gB-Chimären handeln. Diese Vermutung konnte durch eine Behandlung mit Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung im ER, bestätigt werden. Dazu wurden die transfizierten COS7-Zellen 3-4 h vor Beginn und während der 30 minütigen radioaktiven Markierung mit Tunicamycin (50 μ g/ml Medium) inkubiert. Im unteren SDS-Gel von **Abb.5** treten bei beiden Ii/gB-Chimären ohne Tunicamycin zwei Banden auf, die einer glykosylierten und deglykosylierten Form entsprechen. Die obere Bande (glykosylierte Form) verschwindet nach Tunicamycin-Behandlung. Der Größenunterschied von 2,5–3 kDa zwischen den beiden Gelbanden trifft für einen N-gebundenen Zuckerrest zu. Wie aus **Abb.5** weiterhin deutlich wird, können sowohl die glykosylierte als auch die deglykosylierte Form der Ii/gB-Chimären an DR1 und DR3 binden. Der gebundene Zuckerrest im DR1-Bindungsmotiv der Ii/gB-Chimären behindert nicht die Bindung in die Grube des Klasse II-Moleküls.



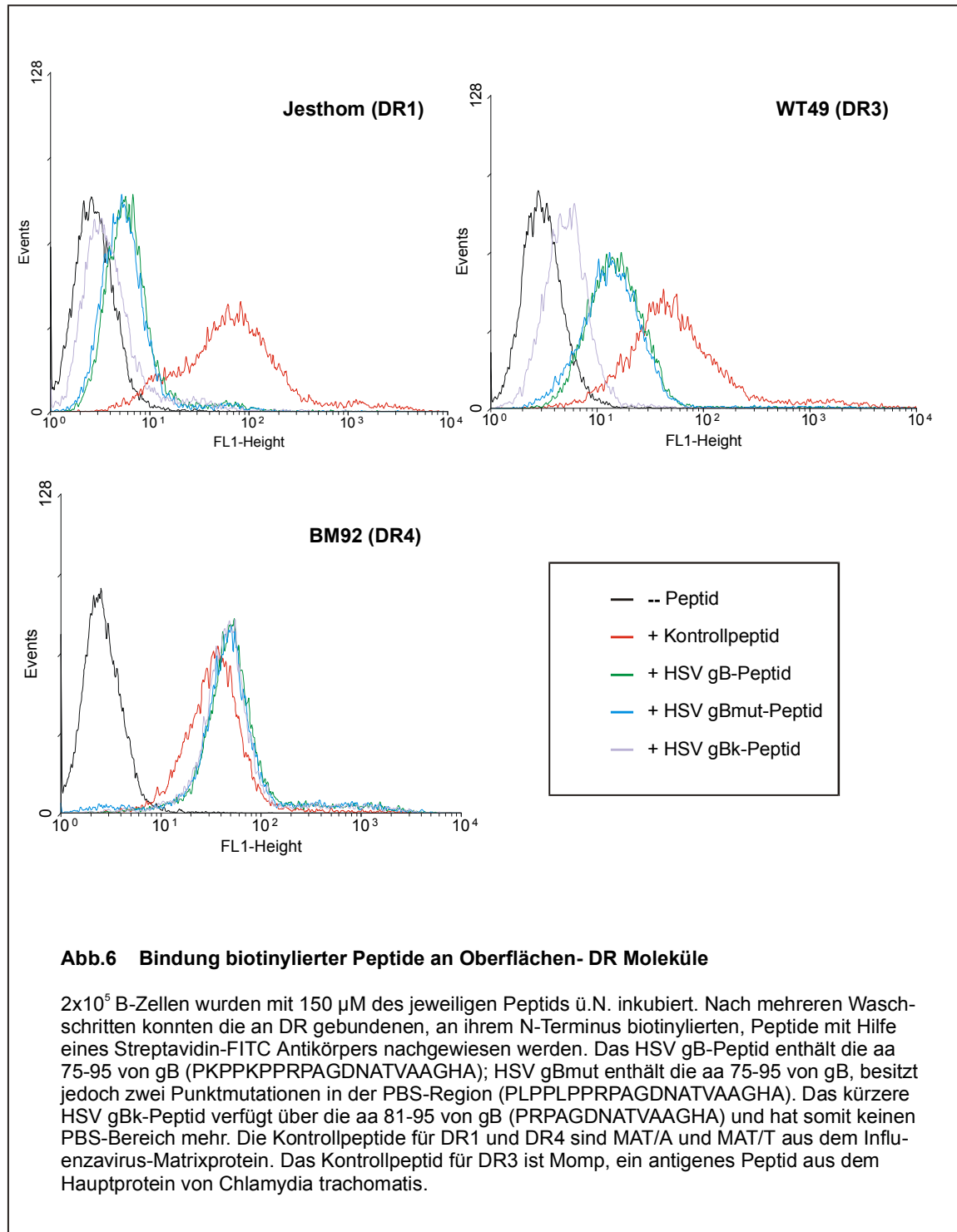
Die Chimäre Ii/gB mit ihrer viralen Sequenz, die für eine PBS und ein DR1-Bindungsmotiv kodiert, assoziiert sehr gut über beide Bereiche mit HLA-DR1. Ihre Assoziation zu HLA-DR3 ist schwächer, da hier lediglich eine Bindung über die PBS-Region stattfindet. Das chimäre Ii/gBmut-Konstrukt mit einer mutierten PBS bindet nur noch schwach an DR1 über seinen Grube-bindenden Bereich. Die Assoziation von Ii/gBmut zu DR3 Molekülen ist gänzlich aufgehoben, da hier neben einer nicht bindenden PBS-Region auch das Bindungsmotiv nicht übereinstimmt. Die chimären Ii/gB-Konstrukte

zeigen also nur dann eine Assoziation zu HLA-DR, wenn die PBS-Region nicht mutiert ist oder der Grube-bindende Bereich Allel-spezifisch binden kann. Die potentielle Klasse II-Bindungsstelle von gB (75-92aa) kann somit die Funktion der MHC Klasse II-Bindungsstelle der Ii übernehmen.

3.6. HSV-Peptid-Bindungen an Oberflächen-DR Moleküle auf humanen B-Zelllymphomen

Um die Peptid-Bindungseigenschaften des gB-Fragmentes (75-92aa) an verschiedenen DR-Molekülen zu testen, wurden humane B-Lymphome mit biotinylierten HSV gB-Peptiden inkubiert. Nach Färbung mit einem Streptavidin-FITC Antikörper, konnte das an DR-gebundene Peptid zytofluorometrisch gemessen werden.

Die verwendeten B-Lymphome exprimieren ca. 2×10^5 spezifischer HLA-DR Moleküle auf ihrer Oberfläche. Die konstante DR-Expression wurde durch eine direkte Färbung mit einem HLA-DR-PE Antikörper überprüft. Die Bindungsfähigkeit der exprimierten DR-Moleküle wurde mit Kontrollpeptiden getestet. Neben dem HSV gB-Peptid (75-95aa) mit der potentiellen Klasse II-Bindungsstelle wurden ein verkürztes HSV gB_k-Peptid (81-95aa) ohne PBS-Region und ein HSV gB_{mut}-Peptid (75-95aa) mit einer mutierten, schlecht bindenden PBS-Region getestet. Da die DR-Expression innerhalb der Einzelmessungen konstant war, sind in **Abb.6** nur die Peptid-Messungen gezeigt.



Bei allen drei getesteten DR-Allotypen ist kein Unterschied im Bindungsverhalten vom HSV gB- und HSV gB_{mut}-Peptid zu sehen. Das kürzere HSV gB_k-Peptid bindet schlechter an DR1 und DR3 als die beiden anderen HSV gB-Peptide, aber alle HSV gB-Peptide binden schlechter als die bei DR3 und DR1 verwendeten Kontrollpeptide. Das HSV gB_k-Peptid zeigt im Falle von DR1-Molekülen fast keine Bindung mehr. In der DR4-Messung

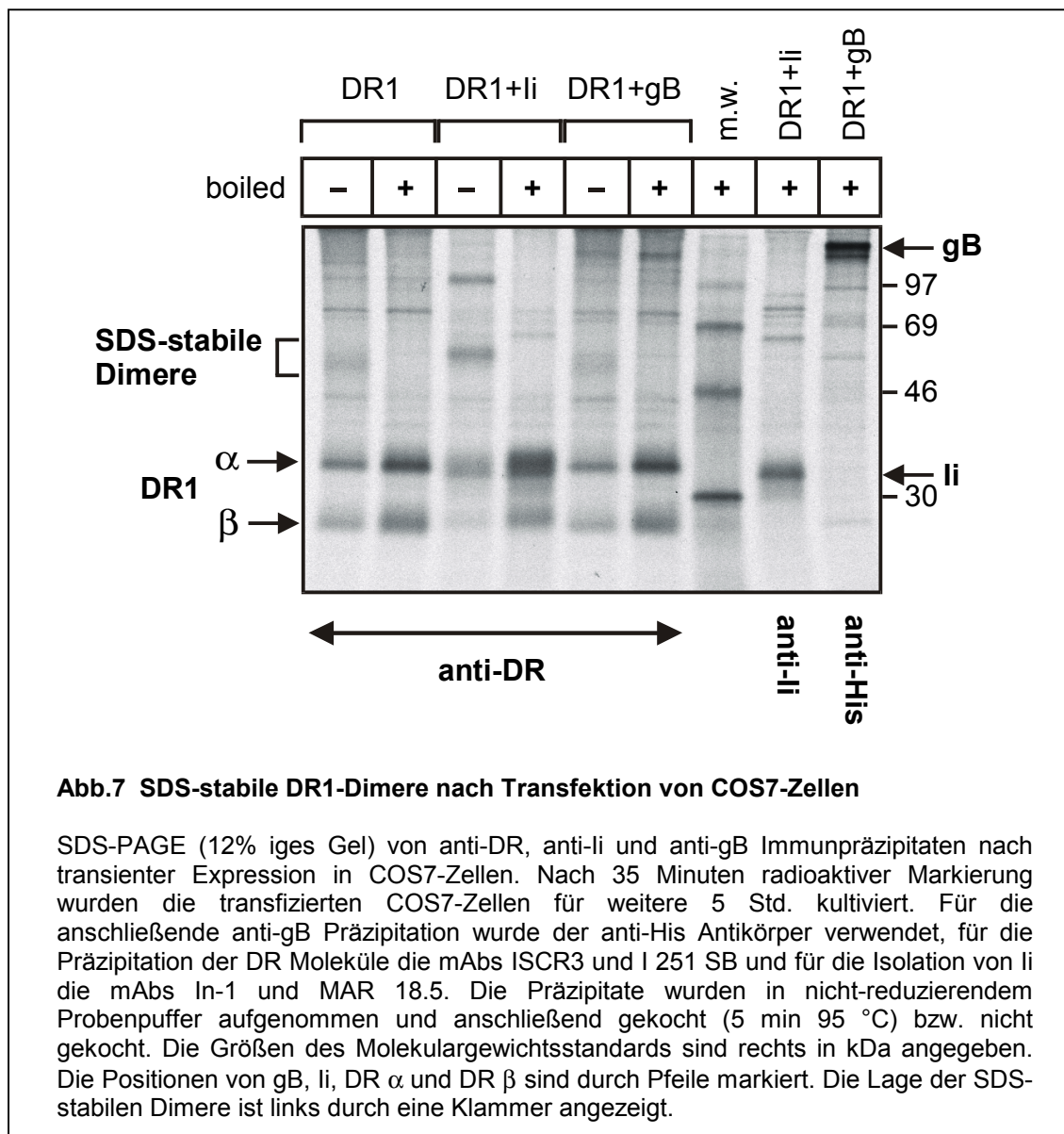
binden jedoch alle verwendeten Peptide -auch das Kontrollpeptid MAT_T und das HSV gB_k-Peptid- mit nahezu gleicher Affinität an das DR4-Molekül. Das Bindungsverhalten der Peptide *in vitro* entspricht nicht dem der Ii/gB-Chimären, die einen deutlichen Unterschied zwischen ursprünglicher und mutierter PBS-Sequenz aufzeigen. Die schlechte Bindung des HSV gB_k-Peptids an DR1 und DR3 kann zwar durch das Fehlen der PBS-Region erklärt werden, aber bei der Bindung an DR4 scheint die PBS-Region überhaupt keine Rolle zu spielen. Peptide müssen eine Mindestlänge haben, um an MHC Klasse II-Moleküle binden zu können. Da alle verwendeten Peptide diese Mindestlänge überschreiten, kann das unterschiedliche Bindungsverhalten auch nicht auf die Länge des Peptids zurückgeführt werden.

3.7 Bindung *in vivo* generierter gB-Peptide an DR-Moleküle

Bei den Peptidbindungsstudien war die Sequenz der HSV gB-Peptide vorgegeben. Nun sollte in einem *in vivo* Experiment untersucht werden, ob nach intrazellulärer Prozessierung von gB Peptide entstehen, die mit Klasse II-Molekülen assoziieren und einen SDS-stabilen Komplex bilden. Dazu wurden COS7-Zellen mit der DNA für DR1 und gB bzw. Ii transfiziert. Nach Prozessierung der Ii entstehen CLIP-Peptide (class II-associated invariant chain peptides), die mit DR1-Molekülen SDS-stabile Dimere bilden. Deshalb diente die Transfektion mit Ii als Positivkontrolle. Die transfizierten COS7-Zellen wurden anschließend 35 min radioaktiv markiert und dann 5 h kultiviert, um die Bildung von stabilen DR-Komplexen zu ermöglichen. In einer darauffolgenden Immunpräzipitation erfolgte die Isolation der DR1-Dimere über die mAb ISCR3 und I 251 SB. Die Präzipitate wurden in nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und dann gekocht (5 min 95 °C) oder nicht-gekocht auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch das Kochen zerfällt der stabile Komplex in α - und β -Kette. SDS-PAGE Analysen haben gezeigt, dass stabile DR1-Komplexe in Abhängigkeit vom gebundenen Peptid unterschiedliche Konformationen eingehen können (Georges et al.; 2000). Das Molekulargewicht der stabilen DR1-Komplexe reicht daher über mehrere kDa.

Abb.7 zeigt die nach der Transfektion isolierten DR1-Dimere. Sehr deutlich sind die stabilen DR1-Komplexe aus der Kotransfektion mit Ii zu sehen. Die Gel-Bande dieser DR1/CLIP Komplexe läuft bei ca. 57 kDa. Nach dem Kochen zerfällt der Komplex in α - und β -Kette, die Dimer-Bande verschwindet und die Banden der α - und β -Kette nehmen

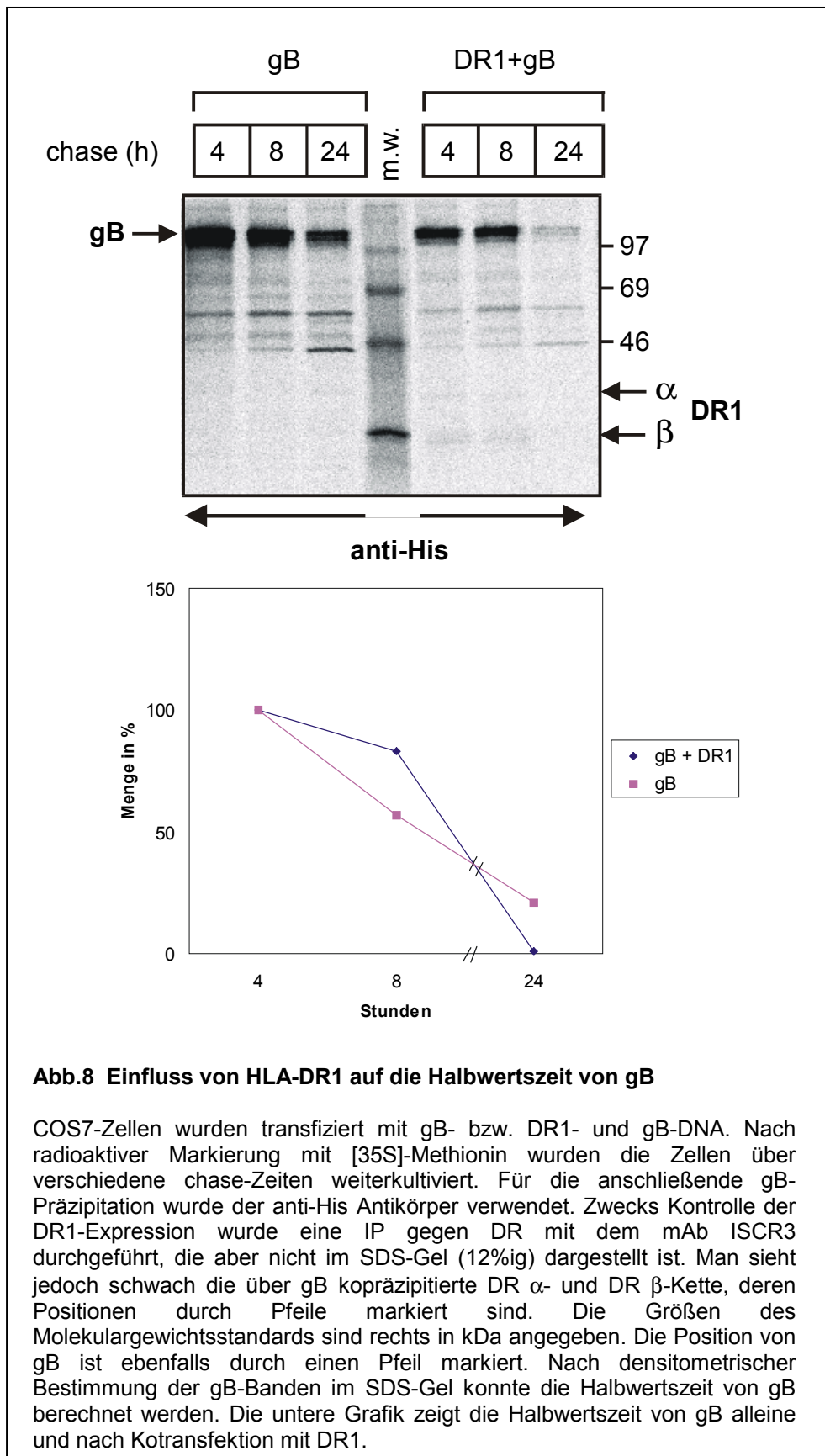
an Intensität zu. Die DR1-Transfektion zeigt, dass DR1-Moleküle ohne Ii geringe Mengen endogener Peptide binden und mit diesen ebenfalls einige stabile Komplexe bilden können. Ihr Molekulargewicht liegt bei ca. 52 kDa. Auch die Kotransfektion mit gB weist geringe Mengen stabiler DR1-Komplexe im Bereich von 52 kDa auf, die nach dem Kochen verschwinden.



3.8 Einfluss von DR-Molekülen auf die Halbwertszeit von gB

Da trotz Assoziation von gB und DR1 keine eindeutig stabilen DR-Peptid-Komplexe entstehen, ist fraglich ob beide Proteine überhaupt das ER verlassen und in die für die Prozessierung wichtigen Kompartimente gelangen. In den folgenden Experimenten sollte

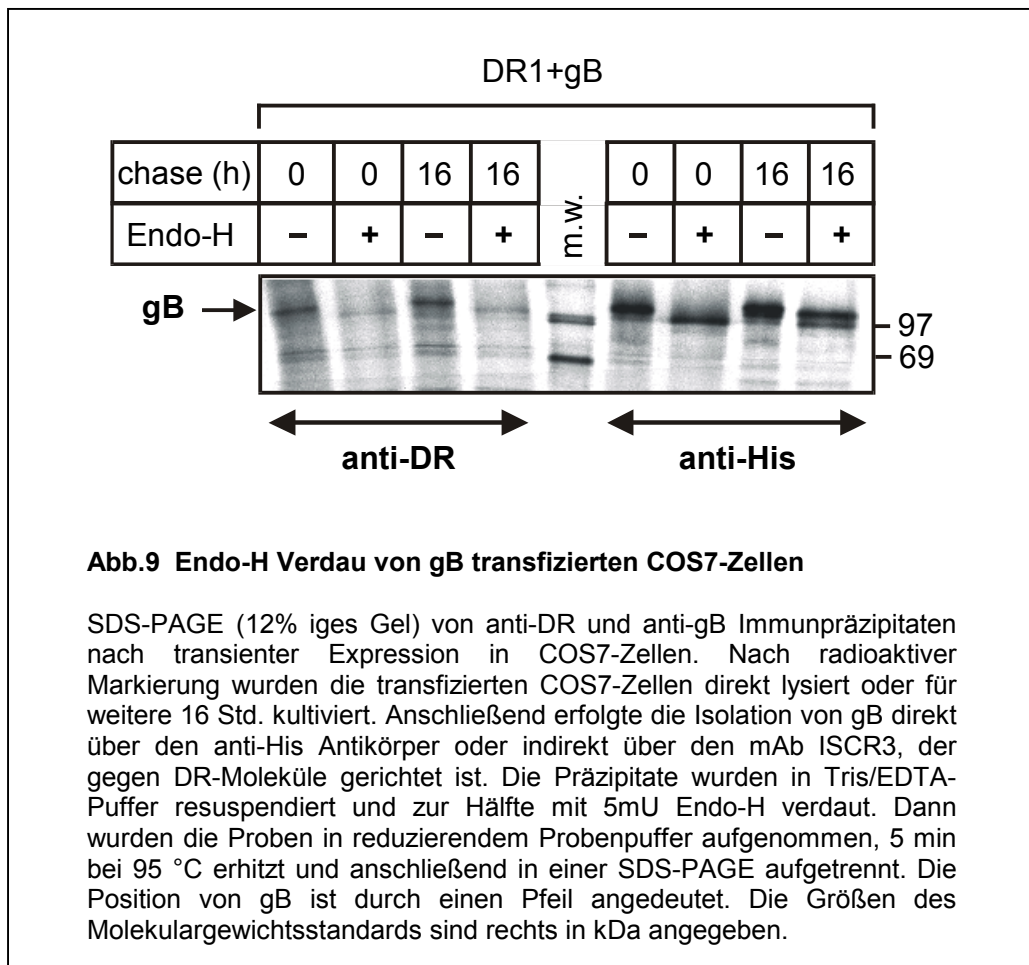
deshalb untersucht werden, inwiefern sich gB und DR gegenseitig beeinflussen. Durch eine Kotransfektion von gB- und DR1-DNA in COS7-Zellen wurde zunächst geprüft, ob DR1 Einfluss auf die Halbwertszeit von gB hat. Hierzu wurden die transfizierten Zellen nach einer 35 minütigen Markierung mit [35 S]-Methionin für verschiedene chase-Zeiten weiterkultiviert. Nach Lyse der Zellen erfolgte eine Immunpräzipitation gegen gB und DR. Die Intensität der gB-Banden im SDS-Gel in **Abb.8** wurde densitometrisch gemessen. Die gB-Menge nach 4 h wurde jeweils mit 100% festgelegt, woraus sich die gB-Menge nach 8 h und 24 h ermitteln lässt. Im SDS-Gel wird deutlich, dass die Expression von gB alleine stärker ist als die von gB nach Kotransfektion mit DR1. Wie jedoch aus dem SDS-Gel und der unteren Grafik in **Abb.8** deutlich wird, besitzt das gB in Anwesenheit von DR1 eine längere Halbwertszeit. Bei alleiniger Expression hat gB eine Halbwertszeit von ca. 8 h. In Anwesenheit von DR1 sind nach 8 h noch etwa 80% der gB-Menge vorhanden. Die längere Halbwertszeit von gB kann durch dessen Retention im ER über DR1 zustande kommen. Möglich ist jedoch auch ein durch DR1 gesteuerter Transport direkt zur Zelloberfläche oder in andere intrazelluläre Kompartimente unter Umgehung der lysosomalen Prozessierungskompartimente.



3.9 Transport von gB aus dem ER in den Golgi-Komplex

Da die Koexpression von HLA-DR1 die Halbwertszeit von gB verlängert, sollte nun mit Hilfe eines Endoglykosidase H Verdaus überprüft werden, ob gB in Anwesenheit von DR1 aus dem ER transportiert oder dort zurückgehalten wird. Die Anhängung von N-gebundenen Zuckerresten an Proteine erfolgt im ER. Beim intrazellulären Transport der Proteine durch den Golgi-Komplex werden die Zuckerseitenketten modifiziert. Der Transport zum Trans-Golgi kann dadurch gezeigt werden, dass N-gebundene Zuckerreste Endoglykosidase H (Endo-H) resistent werden, d.h. die Zuckerreste sind im medialen bzw. Trans-Golgi so modifiziert worden, dass ihre Abspaltung durch Endo-H nicht mehr möglich ist. Bei Proteinen, die das ER noch nicht verlassen haben, die also noch Endo-H sensitiv sind, zeigt sich beim Verdaus mit Endo-H eine Größenabnahme um ca. 2,5-3 kDa pro N-gebundenem Zuckerrest. Für den Endo-H Verdaus wurden die mit DR1 und gB bzw. nur mit gB transfizierten COS7-Zellen zunächst radioaktiv markiert, zum einen Teil direkt lysiert oder aber für einen chase von 16 h weiterkultiviert. Nach Lyse der Zellen erfolgte eine Immunpräzipitation gegen gB und DR. Nach Halbierung der Präzipitate wurde eine Hälfte mit Endo-H verdaut. Hierzu wurden die Präzipitate zunächst in Tris/EDTA-Puffer resuspendiert und anschließend mit oder ohne 5 mU Endo-H für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach Aufnahme in reduzierendem Probenpuffer und Erhitzen für 5 min bei 95 °C wurden die Präzipitate in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

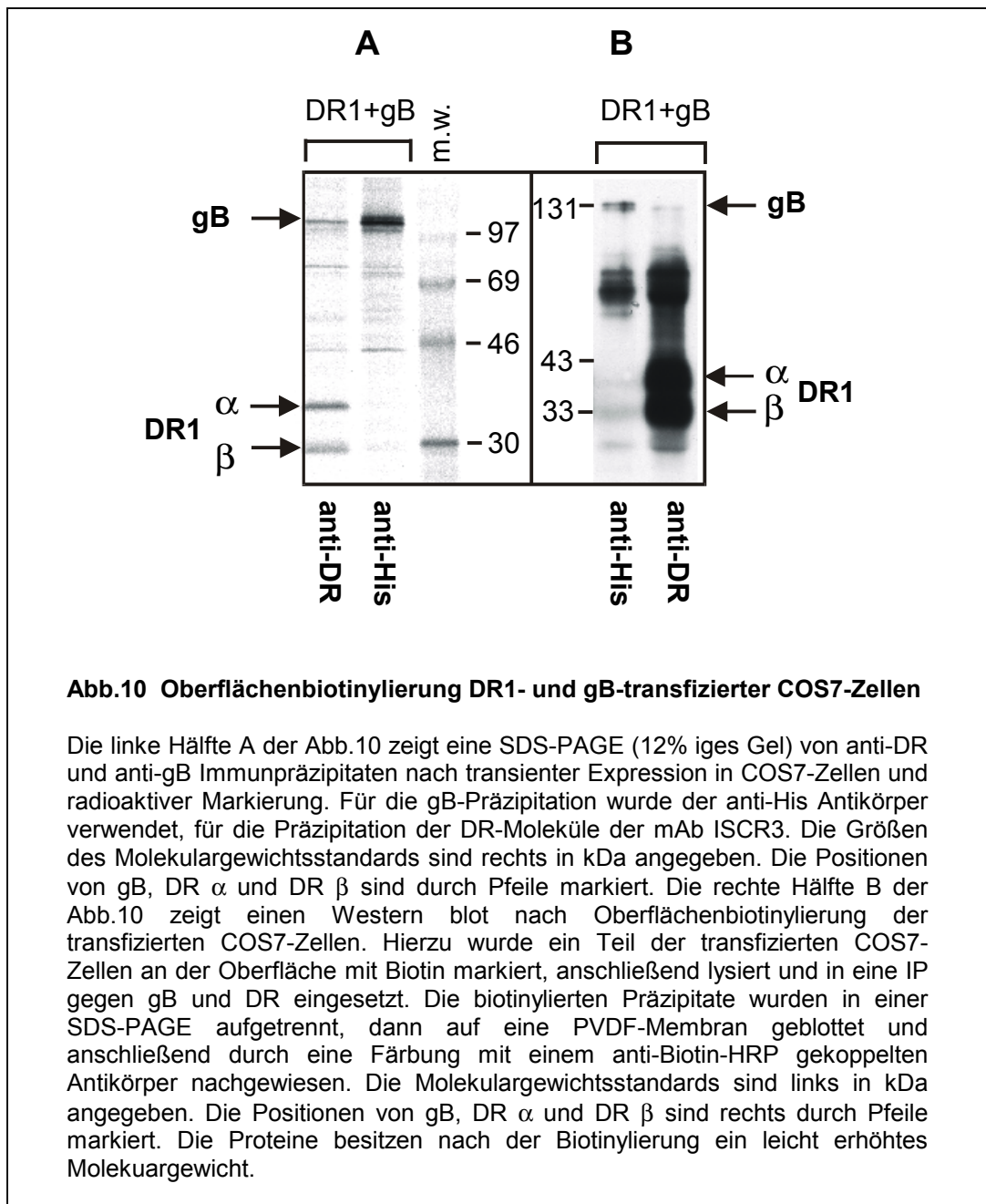
In **Abb.9** sind nach Koexpression mit DR1 Endo-H resistente und sensitive Formen von gB als Bande im SDS-Gel zu sehen. Unmittelbar nach der Synthese von gB im ER ist das Protein noch sensitiv gegenüber Endo-H, was durch die Größenabnahme der gB-Bande im Gel deutlich wird. Nach einem chase von 16 h treten jedoch Endo-H resistente gB-Moleküle auf, deren Bande im SDS-Gel keine Reduktion im Molekulargewicht zeigt. Also finden sich nach 16 h reife gB Moleküle, die das ER verlassen haben und den Trans-Golgi passiert haben. In der Kopräzipitation über DR sind keine Endo-H resistenten gB-Formen zu erkennen, da das Signal zu schwach ist. Auch bei alleiniger Expression von gB (Daten nicht gezeigt) finden sich nach einem chase von 16 h Endo-H resistente gB-Moleküle. Der Transport von gB aus dem ER wird folglich nicht durch DR1-Moleküle gestört. Möglicherweise können einige gB-Moleküle im ER zurückgehalten werden, der Großteil von gB verlässt jedoch das ER und gelangt in den Golgi-Komplex.



3.10 Nachweis von gB- und DR-Molekülen an der Oberfläche transfizierter COS7-Zellen

Wie zuvor gezeigt werden konnte, bewirkt HLA-DR1 keine Retention von gB im ER. Mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung kann nun überprüft werden, ob gB in Koexpression mit DR1 an die Zelloberfläche gelangt. Hierzu wurden COS7-Zellen mit der gB- und DR1-DNA transfiziert. Die Synthese der Proteine wurde nach radioaktiver Markierung direkt durch eine IP gegen DR und gB überprüft, was in **Abb.10** (A) dargestellt ist. DR1 und gB werden exprimiert und assoziieren miteinander. 1×10^6 dieser transfizierten COS7-Zellen wurden für die Oberflächenbiotinylierung eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in Biotinylierungspuffer resuspendiert und anschließend für 15 min mit Biotin markiert. Die Biotinylierung konnte durch Zugabe einer 100 mM Ammoniumchlorid-Lösung gestoppt. Nach Lyse der Zellen erfolgte eine IP gegen DR und gB. Die Präzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran, konnten die biotinylierten Oberflächenmoleküle durch Gegenfärbung mit einem anti-Biotin-HRP

gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden. In **Abb.10** (B) ist auf der rechten Seite das Ergebnis der Biotinylierung gezeigt.



Sehr deutlich sind in der DR-Präzipitation die beiden Ketten von DR1 zu sehen. DR-Moleküle gelangen auch ohne Ii an die Zelloberfläche, was durch eine Einfachtransfektion mit DR1 überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). In der gB-Präzipitation sieht man, dass auch gB an die Zelloberfläche gelangt. Die gB-Menge auf der Oberfläche der transfizierten COS7-Zellen ist jedoch bedeutend geringer als die der DR1-Moleküle. Die biotinylierten

Proteine (B) zeigen ein etwas größeres Molekulargewicht als die radioaktiv markierten Proteine (A), was durch die Biotinylierung zustande kommt.

Bei der Koexpression von gB und DR-Molekülen konnte bisher nur ein Einfluss auf die Halbwertszeit von gB festgestellt werden. Weder der Export aus dem ER noch der Transport zur Zelloberfläche wird durch DR-Moleküle behindert. Da die Assoziation zwischen gB und DR-Molekülen bisher nur mit einem gB-Stamm untersucht wurde, sollten in den folgenden Experimenten auch gBs anderer HSV-1 Stämme getestet werden.

3.11 Sequenzvergleich von gB in verschiedenen HSV-1 Stämmen

Das Glykoprotein B gehört zu den am stärksten konservierten Herpesvirus-Proteinen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch andere HSV-1 Stämme das potentielle Klasse II-Bindungsmotiv besitzen. Der komplette Sequenzvergleich der gBs findet sich im Anhang. In **Abb. 11** ist nur die Region aufgezeigt, in der das potentielle Klasse II-Bindungsmotiv liegt.

Stämme	60	70	80	90 aa
	↓ ↓ ↓		↓ ↓	
gB 17	..GAPPTGDPKPK	KNKK PKPPKP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB ANGpath	..GAPPTGDPKPK	KNKK PKPPKP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB F	..GPAPTGDTPKPK	KNKK PKNP PP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB Miyama	..GPAPTGDTPKPK	KNKK PKNP PP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB KOS	..GAAPTGDPKPK	KNKK PKNP TP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB Patton	..GAAPTGDPKPK	KNKK PKNP TP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>
gB HSZP	..GAAPTGDPKPK	KNKK PKNP TP	PRPAGDNATV	<u>AAGHATLREH.</u>

Abb.11 gB Sequenzvergleich verschiedener HSV-1 Stämme

Der rot markierte Bereich kennzeichnet die PBS-Region, der unterstrichene Bereich die potentielle Klasse II-Bindungsstelle. Der verwendete Stamm 17 hat im Vergleich zu dem in der Datenbank veröffentlichten Stamm 17 eine Punktmutation an Position 73: R73/K73 (fett gedruckt). Die Pfeile markieren Abweichungen innerhalb der Sequenz zwischen den verschiedenen HSV-Stämmen.

Wie aus der **Abb.11** ersichtlich ist, besitzen alle gBs das identische DR1-Bindungsmotiv mit der davor liegenden Spacer-Region (PRP). Die PBS aller HSV-1 Stämme verfügt über randständige Proline (P75aa; P80aa), einen Lysinrest an Position 76aa und einen weiteren

Prolinrest an Position 78aa. Lediglich der Stamm ANGpath besitzt die gleiche PBS-Sequenz wie Stamm 17. Die Sequenzen von gB ANGpath und die von gB 17 sind nahezu identisch. Nur an Position 285aa und 855aa unterscheiden sich ihre Aminosäurereste.

3.12 Assoziation zwischen gBs verschiedener HSV-1 Stämme und DR-Molekülen

Da sich die potentielle Klasse II-Bindungssequenz der gBs aus verschiedenen HSV-1 Stämmen in der PBS-Region unterscheidet, wurden zusätzlich die gBs der Stämme ANGpath und KOS auf ihre Assoziation mit HLA-DR Molekülen getestet. Nach ihrer Amplifizierung wurde die jeweilige gB-DNA -wie zuvor die des Stammes 17- in den pcDNA3.1(-)Myc/HisA Vektor kloniert. Die Expression der gBs erfolgt ebenfalls mit einem C-terminalen His-Tag, über den sie dann in einer Immunpräzipitation mit einem anti-His Antikörper isoliert werden können. Auch diesmal wurde die Assoziation in COS7-Zellen untersucht. In **Abb.12** wird gezeigt, dass auch gBs anderer HSV-1 Stämme an DR1- und DR3-Moleküle binden können.

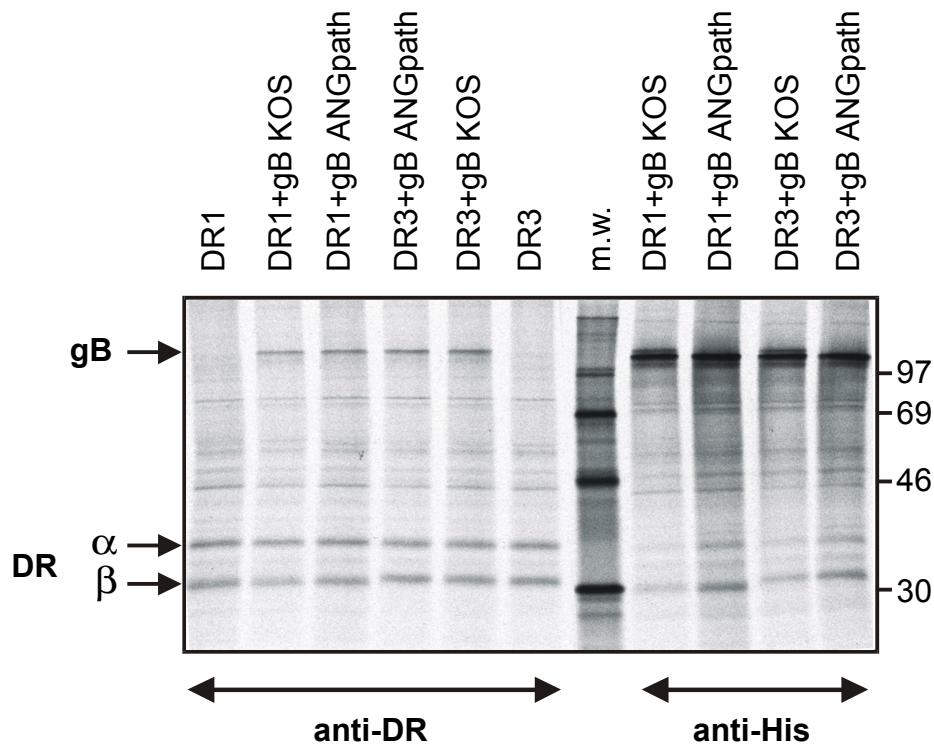


Abb.12 Assoziation von gBs verschiedener HSV-1 Stämme mit DR-Molekülen

SDS-PAGE (12% iges Gel) von anti-gB und anti-DR Immunpräzipitaten nach transienter Expression in COS7-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden für 35 min radioaktiv markiert und dann in eine IP eingesetzt. Für die gB-Präzipitation wurde der anti-His Antikörper verwendet und für die von DR der mAb ISCR3. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind rechts in kDa angegeben. Die Positionen von gB, DR α und DR β sind links markiert.

Die gBs der Stämme KOS und ANGpath assoziieren ebenso wie gB 17 mit DR1- und DR3-Molekülen. Aufgrund der großen Homologie zwischen den gBs, ist auch ein gleiches Bindungsverhalten zu erklären.

In Maus-Infektionsversuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die HSV-1 Stämme in ihrer Pathogenität gegenüber Mäusen unterscheiden, was wiederum auf das gB zurückzuführen ist. Der Stamm ANGpath besitzt eine hohe Pathogenität, wohingegen der Stamm KOS nur in geringem Maße pathogen ist. Wird das gB von ANGpath gegen das gB von KOS ausgetauscht, so verringert sich die Pathogenität des rekombinanten Virus (Kostal et al., 1994).

Die Empfindlichkeit von Inzucht-Mausstämmen gegenüber HSV-1 ist ebenfalls unterschiedlich. C57BL/6 Mäuse mit einem H-2^b Haplotyp sind resistent gegen HSV-1

Infektionen, wohingegen BALB/c (H-2^d), AKR (H-2^k) und DBA (H-2^d) Mäuse sehr empfindlich reagieren (Lopez 1975). Ob die unterschiedliche Pathogenität verschiedener HSV-1 Stämme und die unterschiedliche Empfindlichkeit verschiedener Mausstämmen möglicherweise auf einer Assoziation mit MHC Klasse II-Molekülen beruht, sollte in den folgenden Untersuchungen geklärt werden

3.13 Bindung von gB KOS und gB ANGpath an Maus Klasse II-Moleküle

Da die potentielle Klasse II-Bindungsstelle von gB auch ein schwaches Bindungsmotiv für IA^k-Moleküle enthält, und Mäuse diesen Haplotyps sensitiv auf HSV-1 Infektionen reagieren, wurde in den folgenden Untersuchungen mit IA^k-Molekülen und den gBs von KOS und ANGpath gearbeitet. Die Assoziation wurde in transfizierten COS7-Zellen untersucht. Wie aus **Abb.13** deutlich wird, binden gB KOS und gB ANGpath auch an das IA^k Maus Klasse II-Molekül. Die Kopräzipitation von IA^k über gB ist -wie im Fall von DR- nur sehr schwach zu sehen, was auf eine Überexpression von gB zurückzuführen ist.

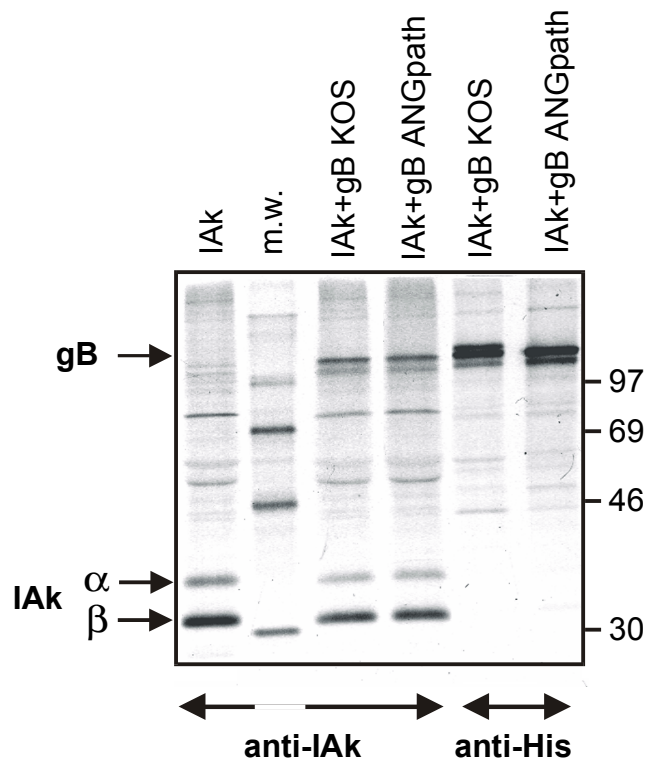


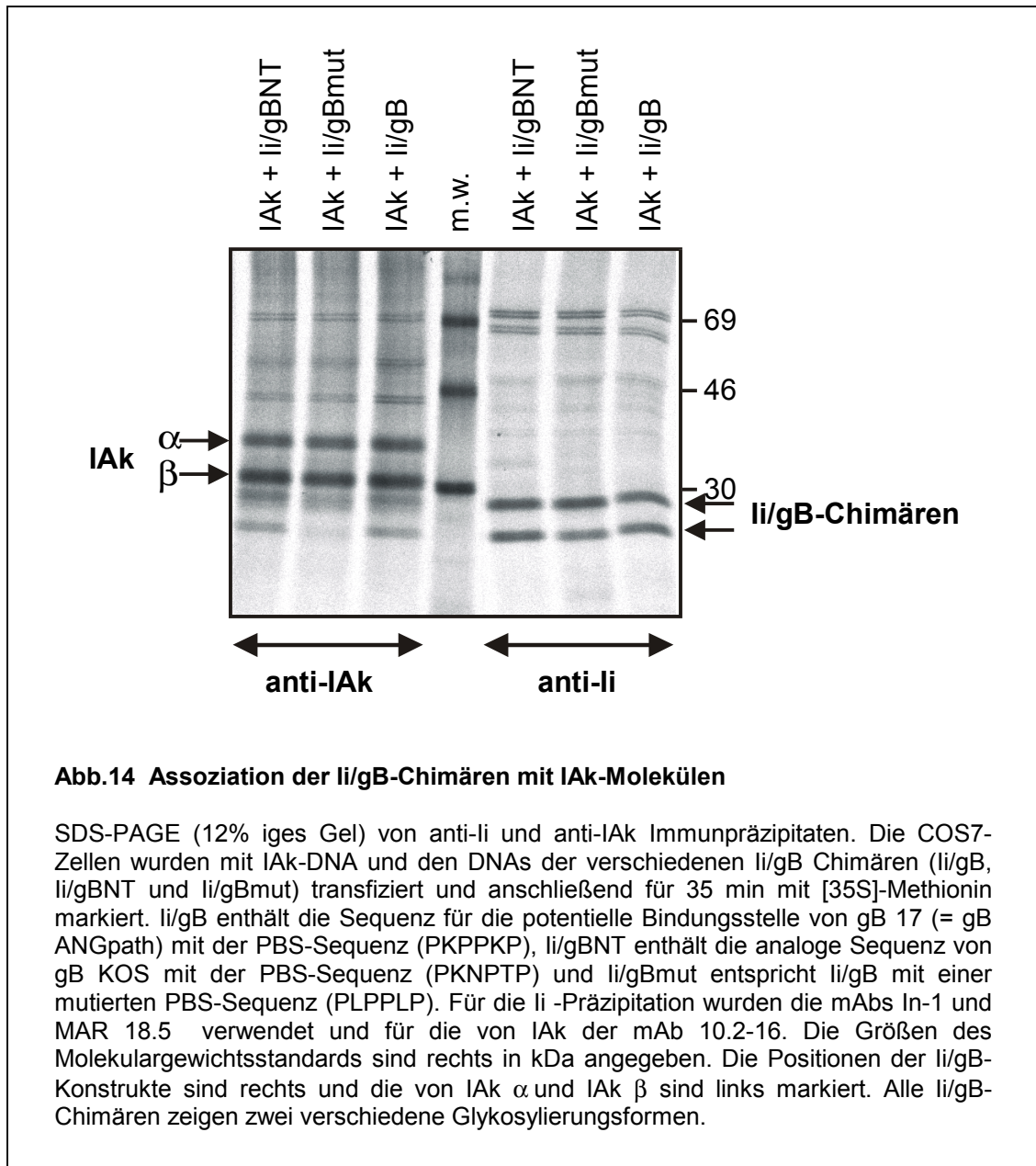
Abb.13 Bindung von gB KOS und gB ANGpath an IAk

SDS-PAGE (12% iges Gel) von anti-gB und anti-IAk Immunpräzipitaten nach transienter Expression in COS7-Zellen. Die transfizierten Zellen wurden für 35 Minuten radioaktiv markiert, anschließend lysiert und dann in eine IP eingesetzt. Für die Präzipitation von gB wurde der anti-His Antikörper verwendet und für die von IAk der mAb 10.2-16. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind rechts in kDa angegeben. Die Positionen von gB, IAk α und IAk β sind links durch Pfeile markiert.

3.14 Assoziation zwischen chimären Ii/gB-Konstrukten und IA^k-Molekülen

Um die Bindungseigenschaften von gB-Fragmenten (75-92aa) verschiedener HSV-1 Stämme gegenüber Maus Klasse II-Molekülen zu testen, wurde neben den bereits bestehenden Ii/gB-Chimären (Ii/gB und Ii/gBmut) noch ein Ii/gB_{NT}-Konstrukt hergestellt. Ii/gB enthält die gB-Region mit der potentiellen Klasse II-Bindungsstelle aus dem HSV-1 Stamm 17, der in diesem Bereich identisch ist zum Stamm ANGpath (PKPPKPPRPAGDNATVAA). Ii/gBmut entspricht Ii/gB mit zusätzlichen Mutationen in der PBS-Region (PLPPLPPRPAGDNATVAA). Ii/gB_{NT} wurde auf die gleiche Weise kloniert (s.Abb.3) und enthält den gB-Bereich (75-92aa) aus dem HSV-1 Stamm KOS, der

sich innerhalb der PBS-Region durch ein Asparagin (N) und ein Threonin (T) von den anderen Stämmen unterscheidet (PKNPTPPRPAGDNATVAA). Nach einer Kotransfektion dieser chimären Ii/gB-Konstrukte mit IA^k-Molekülen zeigt sich, wie bereits zuvor mit DR-Molekülen, eine Assoziation zwischen den Ii/gB-Chimären und IA^k-Molekülen (s. **Abb.14**).



Sowohl Ii/gB als auch Ii/gB_{NT} binden gut an IA^k-Moleküle. Somit scheint auch die PBS-Region von gB KOS funktionell zu sein, was auch durch die Assoziation von gB KOS mit IA^k bestätigt wird. Das schwache IA^k-Motiv (score 20) trägt nur in geringem Maße zur

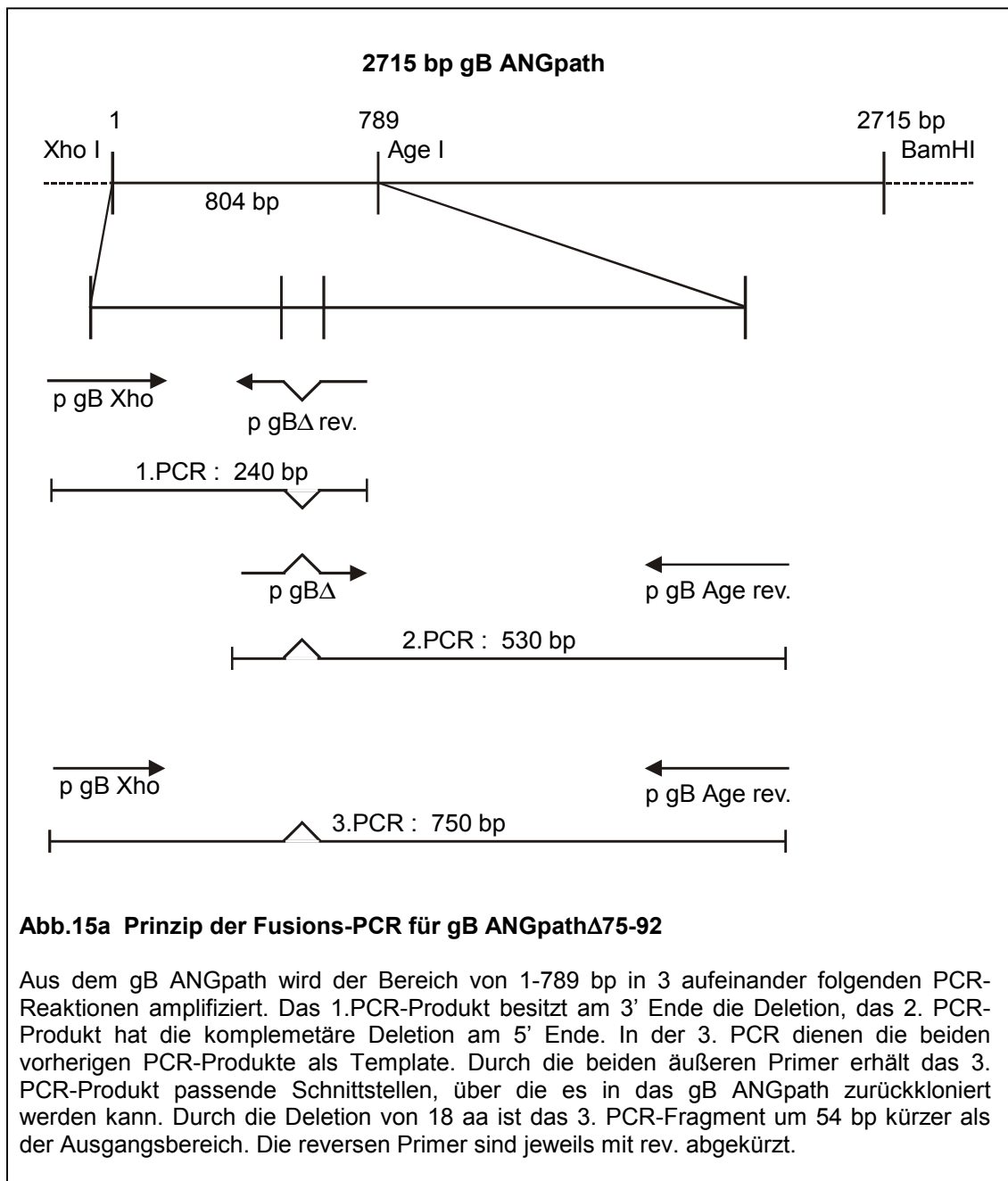
Bindung bei, denn das Ii/gBmut-Konstrukt mit einer mutierten PBS-Region, assoziiert bedeutend schwächer mit IA^k-Molekülen. Die Expression der Ii/gB-Chimären ist nahezu gleich stark, was durch die Präzipitation gegen Ii gezeigt wird.

3.15 Konstruktion von gB ANGpath Δ 75-92 und gB ANGpath_{NT}

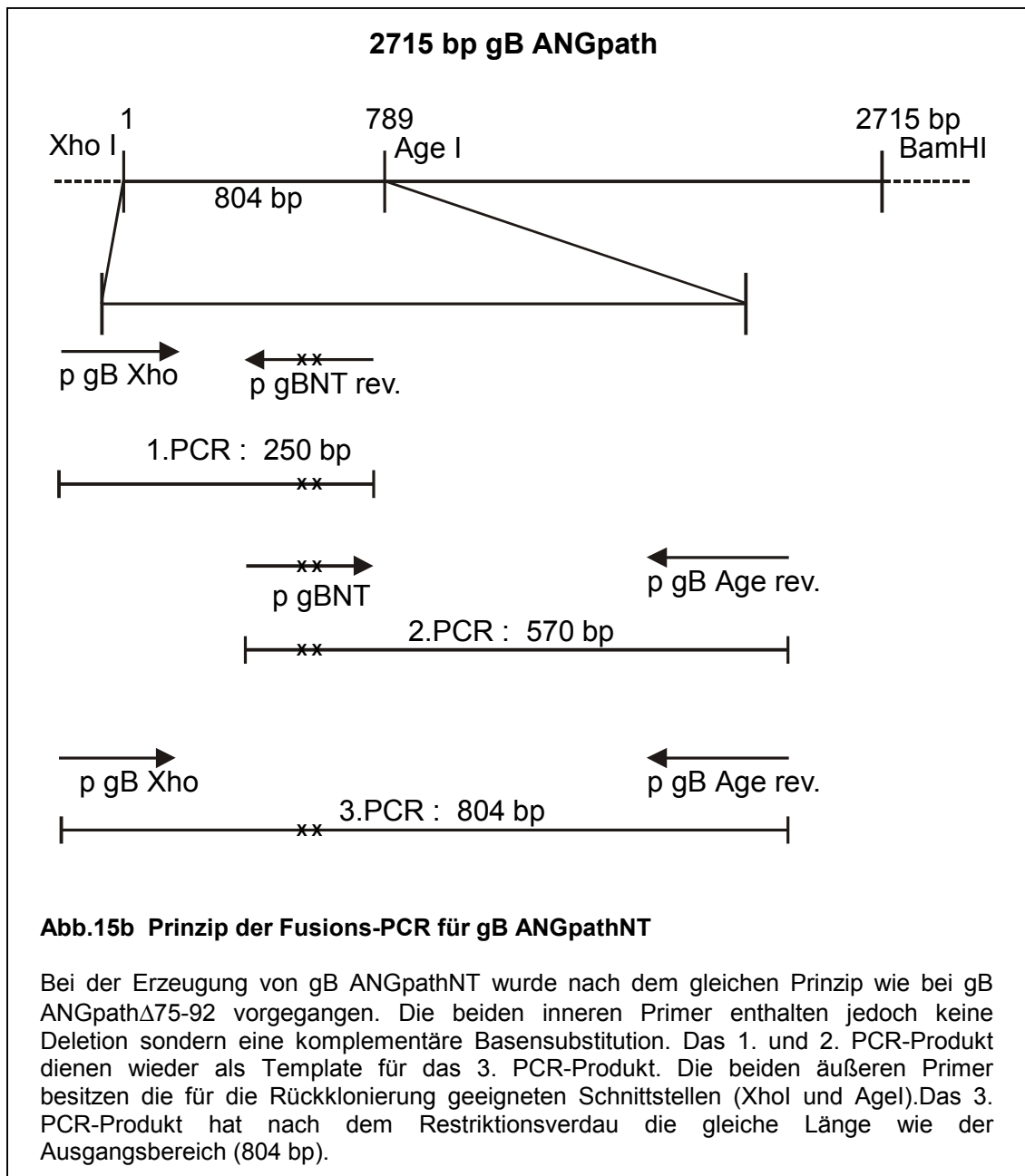
Ob die potentielle Klasse II-Bindungsstelle in gB einzigartig ist, oder ob auch noch zusätzliche Bindungsstellen vorhanden sind, kann mit Hilfe eines gB-Deletionskonstruktes ohne potentielle Bindungsstelle getestet werden (gB ANGpath Δ 75-92).

Weiterhin sollte auch mit einem Austausch der potentiellen Bindungsregion von dem minder pathogenen Stamm KOS auf den hoch pathogenen Stamm ANGpath untersucht werden, ob die Substitution einen Einfluss auf die Assoziation hat (gB ANGpath_{NT}).

Beide Konstrukte wurden mit Hilfe einer Fusions-PCR (s. 2.1.6) hergestellt. **Abb.15 a** und **Abb.15 b** zeigen die Vorgehensweise zur Erzeugung der beiden Konstrukte.



Die Erzeugung von gB ANGpathNT beruht auf dem gleichen Prinzip, s. **Abb.15b**.



3.16 Assoziation von gB ANGpath_{NT} und gB ANGpath Δ 75-92 mit IA^k- und DR-Molekülen

Beide gB-Konstrukte wurden auf ihr Bindungsvermögen gegenüber IA^k-Molekülen getestet. Dazu erfolgte eine Kotransfektion von COS7-Zellen mit der jeweiligen gB-DNA und der IA^k-DNA. In **Abb.16** wird gezeigt, dass sowohl gB ANGpathNT als auch gB ANGpath Δ 75-92 mit IA^k-Molekülen assoziieren.

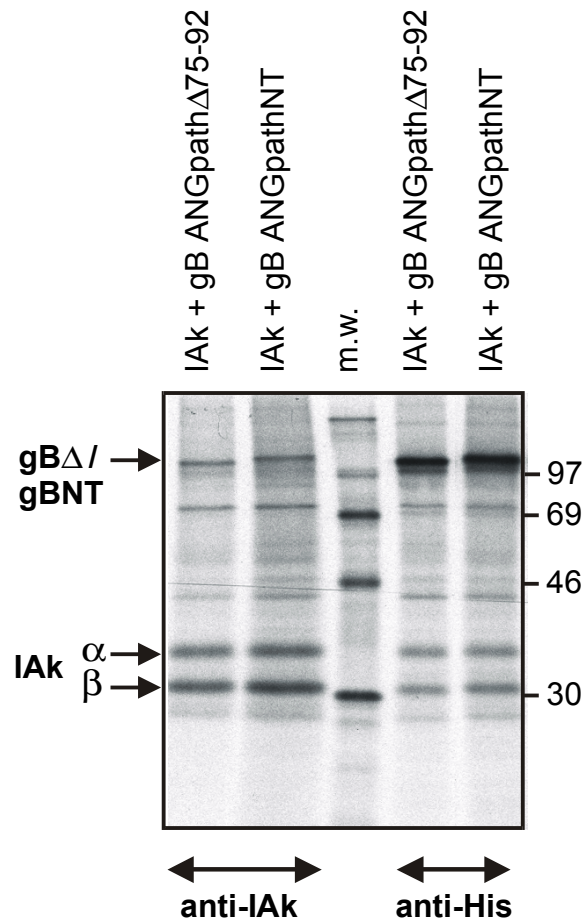


Abb.16 Bindung von gB ANGpath-Konstrukten an IAK

SDS-PAGE (12% iges Gel) von anti-gB und anti-IAk Immunpräzipitaten nach transienter Expression in COS7-Zellen. Die transfizierten COS-Zellen wurden für 35 min radioaktiv markiert und anschließend lysiert. Für die gB-Präzipitation wurde der anti-His Antikörper verwendet und für die von IAK der mAb 10.2-16. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind rechts in kDa angegeben. Die Positionen der gB-Konstrukte, IAK- α und IAK- β sind links markiert. Das Deletions-Konstrukt läuft aufgrund des geringeren Molekulargewichtes etwas tiefer als gB ANGpathNT.

Das Bindungsverhalten der gB ANGpath-Konstrukte wurde anschließend auch gegenüber humanen DR-Molekülen getestet. In **Abb.17** ist deren Assoziation mit DR1- und DR3-Molekülen gezeigt.

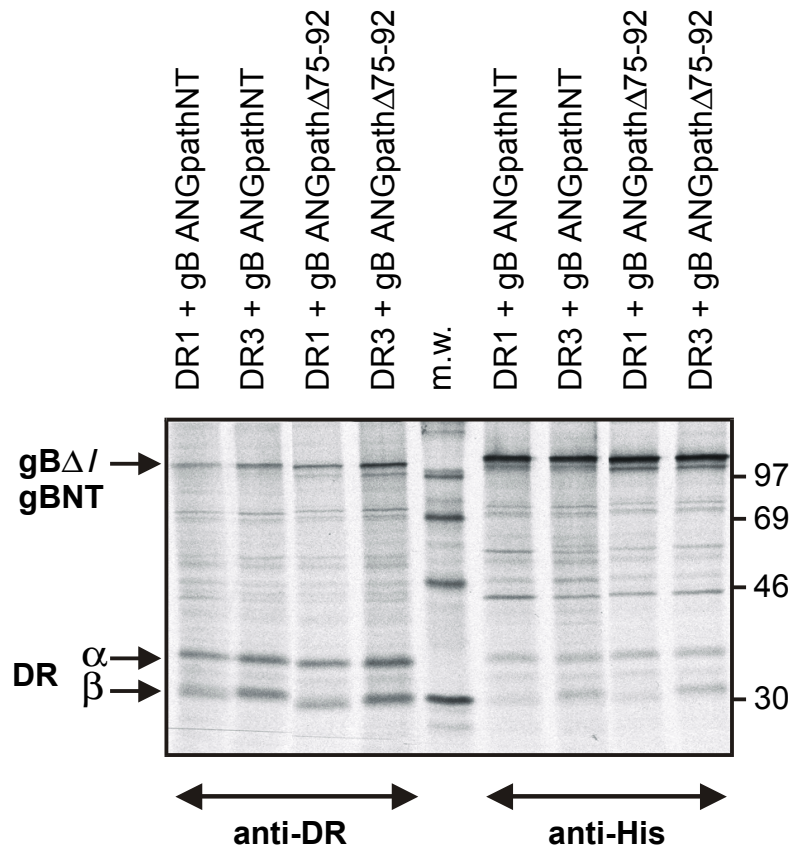


Abb.17 Bindung der gB ANGpath-Konstrukte an DR-Moleküle

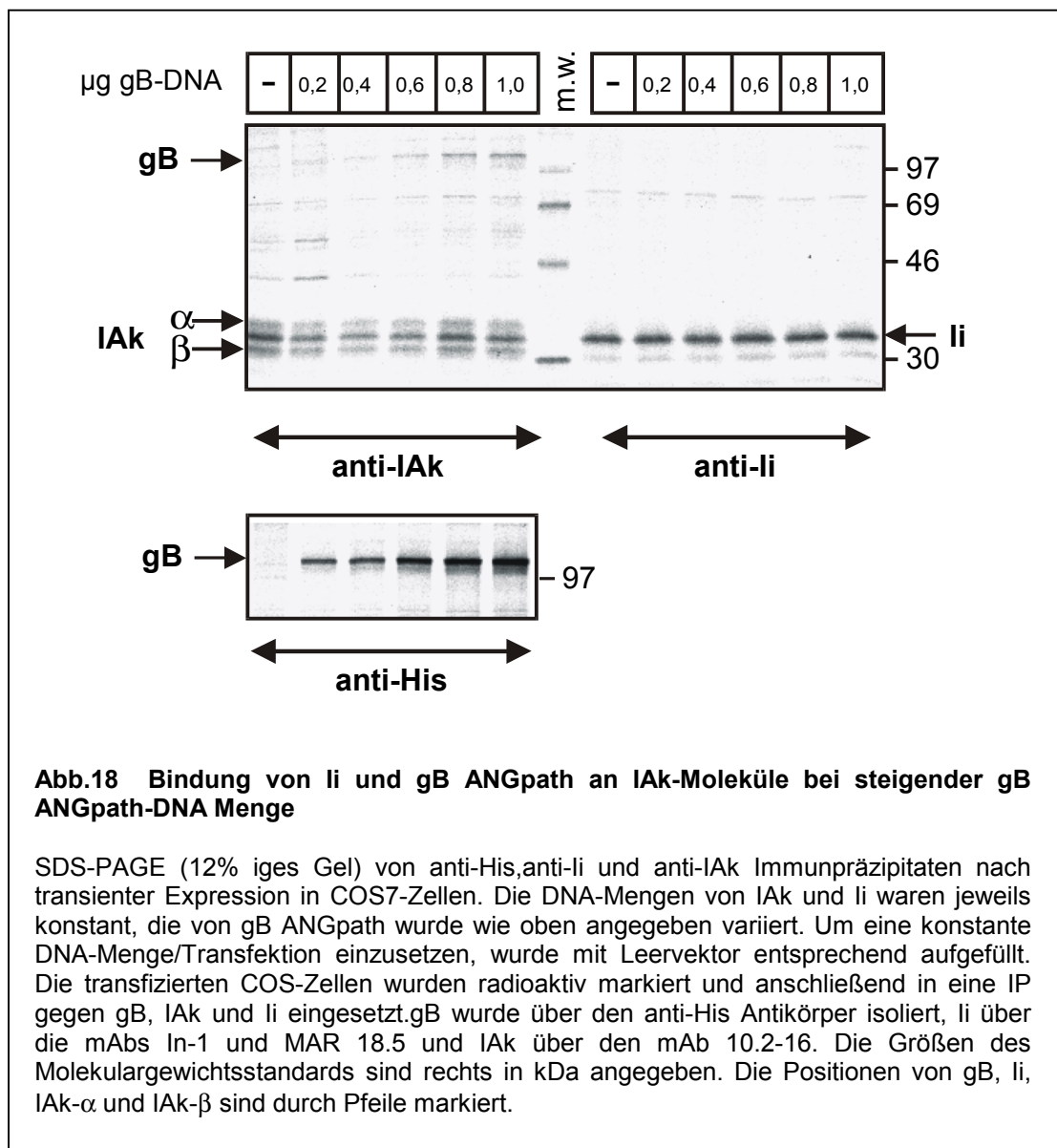
SDS-PAGE (12% iges Gel) von anti-gB und anti-DR Immunpräzipitaten nach transients Expression in COS7-Zellen. Nach radioaktiver Markierung wurden die transfizierten COS-Zellen lysiert und das Lysat in eine IP eingesetzt. Für die gB-Präzipitation wurde der anti-His Antikörper verwendet und für die Isolation von DR der mAb ISCR3. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind rechts in kDa angegeben. Die Positionen der gB-Konstrukte, DR- α und DR- β sind links markiert.

Da neben IA^k - auch DR1- und DR3-Moleküle an das gB-Deletionskonstrukt binden können, sind vermutlich mehrere Bindungsstellen im gB vorhanden, die für die Assoziation mit humanen und Maus Klasse II-Molekülen verantwortlich sind.

3.17 Ii und gB ANGpath binden nach Kotransfektion an IA^k -Moleküle

Mit Hilfe von Wettbewerbsversuchen sollte festgestellt werden, ob gB in Konkurrenz zur Ii steht und diese bei der Bindung an Klasse II-Moleküle verdrängen kann. Dazu wurden COS7-Zellen mit variierenden Mengen an gB ANGpath- bzw. Ii-DNA und einer konstanten Menge an IA^k -DNA transfiziert, radioaktiv markiert und nach einer

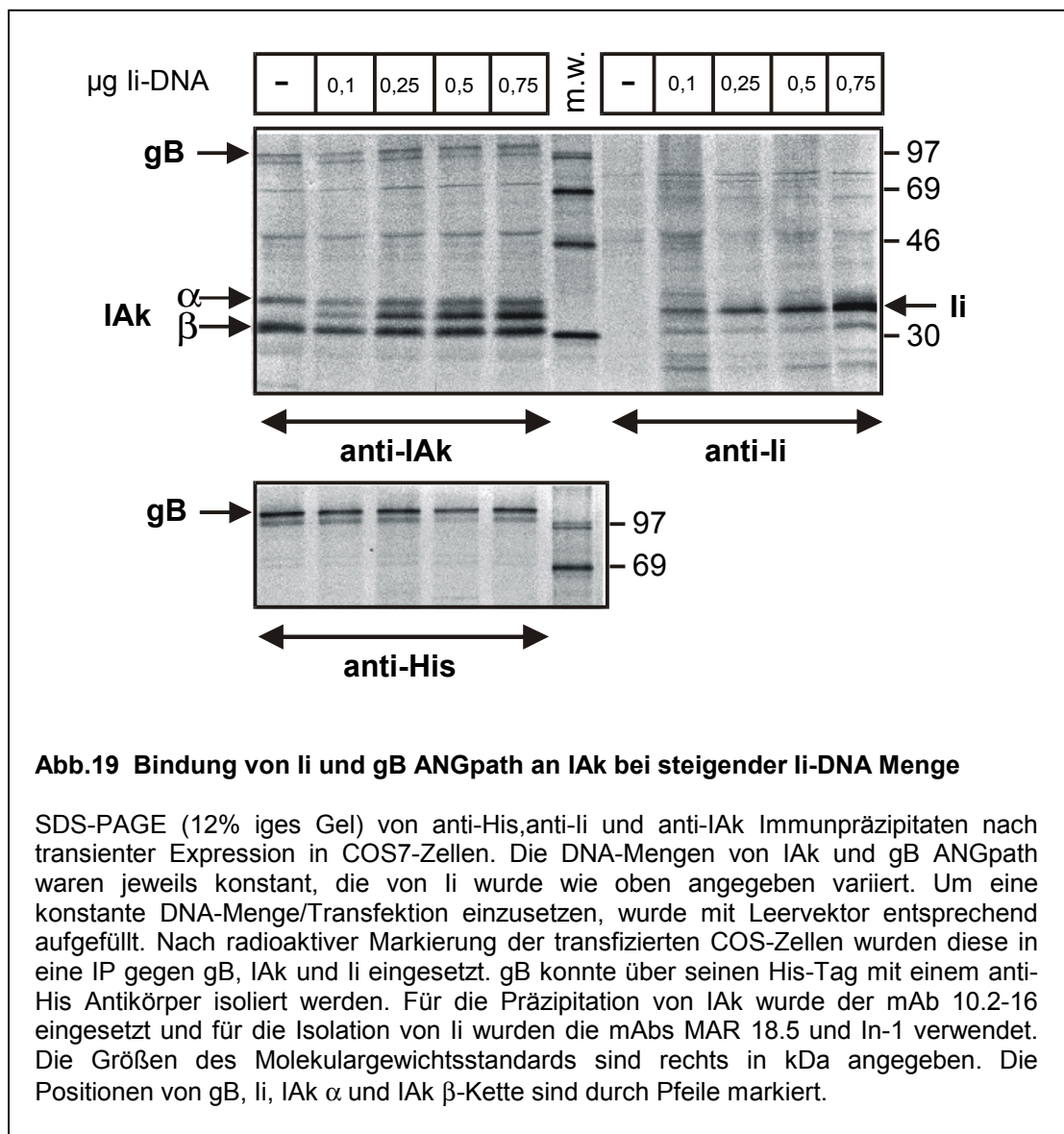
Immunpräzipitation in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Um eine konstante DNA-Gesamtmenge von 1,6 μg pro Transfektion (Menge nach Optimierung) zu erhalten, wurde jeweils mit Leervektor (pcDNA3.1(-)Myc/HisA bei gB bzw. pcEXV3 bei li) aufgefüllt. Die über IA^{k} -koprazipitierte li- und gB-Proteinmenge wurde analysiert. **Abb.18** zeigt eine Koprazipitation mit konstanter Menge an IA^{k} - und li-DNA und steigender Menge an gB ANGpath-DNA.



Mit zunehmender Menge an gB ANGpath-DNA steigt auch die Expressionsrate von gB, was durch die anti-His Präzipitation gegen gB/His deutlich wird. Auch die Menge an koprazipitiertem gB ANGpath nimmt mit steigender Expressionsrate zu, was durch die

anti-IA^k-Präzipitation deutlich wird. Die Expressionsrate der Ii ist konstant, wie die anti-Ii-Präzipitation zeigt. Die über IA^k koisolierte Ii-Menge ist ohne gB am höchsten, verringert sich aber bereits nach Zugabe von 0,2 µg gB ANGpath-DNA und bleibt dann nahezu konstant.

In **Abb.19** ist eine Kotransfektion von COS7-Zellen mit konstanter Menge an IA^k- und gB ANGpath-DNA und steigender Menge an Ii-DNA zu sehen.

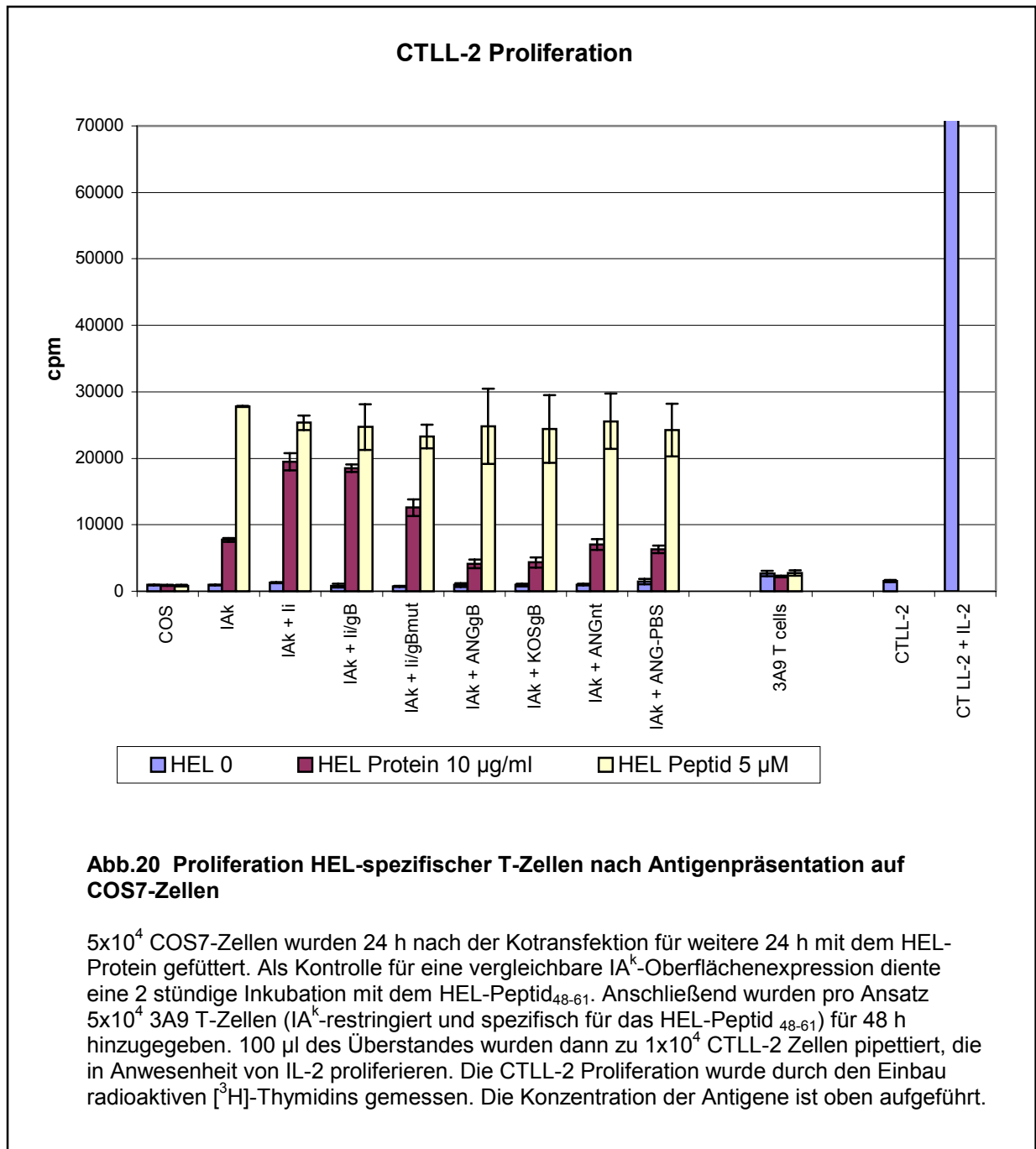


Trotz zunehmender Menge an Ii-DNA bleibt die über IA^k kopräzipitierte gB ANGpath-Menge konstant. Die Expressionsrate der Ii steigt mit zunehmender Ii-DNA Menge, die von gB ANGpath bleibt konstant. Die über IA^k kopräzipitierte Ii-Menge steigt mit

zunehmender Ii-Expression an. Sie kann jedoch nicht gB ANGpath bei der Bindung an IA^k-Moleküle verdrängen.

3.18 Einfluss von gB auf die HEL-Antigenpräsentation in COS7-Zellen

Da bis auf die Ii/gBmut-Chimäre alle in dieser Arbeit erzeugten gB-Konstrukte gut an IA^k-Moleküle binden, sollte nun getestet werden, ob die Konstrukte über die Assoziation mit Klasse II-Molekülen in die für die Antigenprozessierung und -präsentation wichtigen Kompartimente gelangen und die Funktion der Ii übernehmen können. Hierzu wurden COS7-Zellen mit der IA^k-DNA und der des jeweiligen gB-Konstruktes transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit dem HEL-Protein oder dem HEL-Peptid₄₈₋₆₁ gefüttert und dann für 48 h mit den spezifischen IA^k-restringierten T-Zellen (3A9-Zellen spezifisch für das HEL-Peptid₄₈₋₆₁) inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde indirekt über ihre IL-2 Produktion gemessen. Für die Präsentation des HEL-Peptids wird die Ii benötigt. In **Abb. 20** ist die Proliferation von IL-2 abhängig wachsenden CTLL-2 Zellen dargestellt.



Wie aus dem Balkendiagramm deutlich wird, ist die T-Zellproliferation nach Peptidbeladung (gelbe Balken) aller IA^k-transfizierten Zellen nahezu gleich. Das bedeutet, dass die Oberflächenexpression der IA^k-Moleküle in allen Transfektionen nahezu konstant war. Die Ii/gB-Chimäre zeigt annähernd die gleiche HEL-Präsentation wie die Ii, kann diese folglich ersetzen. Trotz schwacher Bindung von Ii/gBmut an IA^k-Moleküle ist auch hier eine HEL-Präsentation in geringerem Ausmaße vorhanden. Alle anderen gB-Konstrukte können trotz ihrer Assoziation mit IA^k-Molekülen nicht die Funktion der Ii übernehmen.

4. Diskussion

Virale Genprodukte und deren Wirkung, die zu einer verminderten Antigenpräsentation durch MHC Klasse I-Moleküle führen, sind häufig beschrieben worden. Da aber besonders bei latent persistierenden Herpesviren, die jederzeit reaktiviert werden können, vor allem die CD4⁺T-Zellantwort eine Virusausbreitung im Wirt verhindert, werden hier auch virale Abwehrmechanismen vermutet, die Einfluss auf die Antigenpräsentation durch MHC Klasse II-Moleküle haben. Einige wenige wurden bereits beschrieben:

Nach intraokularer Impfung verursacht HSV-1 Stamm F in BALB/c-Mäusen eine latente Infektion des Gehirns wohingegen HSV-1 Stamm KOS zu einer tödlichen Infektion führt. Im Falle von Stamm F zeigen die infizierten Hirnregionen eine normale Klasse II-Expression auf der Zelloberfläche von Mikrogliazellen, Astrocyten und eingewanderten Makrophagen. Eine HSV-1 Infektion mit dem Stamm KOS hingegen zeigt eine vorwiegend intrazelluläre Lokalisation von Klasse II-Molekülen, was eine gestörte Antigenpräsentation vermuten lässt. Die genauen Ursachen der Klasse II-Retention konnten jedoch noch nicht ermittelt werden (Lewandowski et al., 1993). EBV, ein weiteres Herpesvirus, bindet über sein BZLF2-Protein an HLA-DR Moleküle und nutzt diese als Cofaktoren für eine Infektion von B-Zellen. Zwar bewirkt BZLF2 keine verminderte Klasse II-Oberflächenexpression, kann jedoch *in vitro* die MHC II-restringierte Antigenpräsentation unterdrücken. Die genaue Funktion von BZLF2 während einer EBV-Infektion muss noch geklärt werden. (Spriggs et al., 1996). HCMV ist in der Lage, die IFN-gesteuerte Expression zellulärer Proteine zu beeinflussen. Es hemmt nicht nur die IFN- α stimulierte MHC Klasse I-Expression sondern auch die IFN- γ gesteuerte MHC Klasse II-Expression. Dies wird durch einen vermehrten Abbau zweier essentieller Komponenten der IFN-Signal-Transduktionskaskade (Janus Kinase 1 und p48) erreicht (Miller et al., 1998 und 1999). An diesen Beispielen wird deutlich, dass zwar einige Herpesviren die MHC II-Antigenpräsentation beeinflussen können, bisher aber nur sehr wenig über die Mechanismen und die viralen Genprodukte bekannt ist, die zu einer Unterdrückung der CD4⁺T-Zellantwort führen.

4.1 Assoziation zwischen gB und Klasse II-Molekülen verschiedenen Allotyps und unterschiedlicher Spezies

In dem Glykoprotein B (gB) des Herpes Simplex Virus Typ 1 (Stamm 17) wurde ein Sequenz entdeckt, die identisch zu einer Sequenz innerhalb der Invarianten Kette (Ii) ist und dort für einen Bereich kodiert, der promiskuitive Bindungseigenschaften für MHC Klasse II-Moleküle aufweist. In beiden Sequenzen folgt hinter der promiskuitiven Bindungsstelle eine Region mit einem Bindungsmotiv für Klasse II-Moleküle, sodass der gesamte Bereich im gB der MHC Klasse II-Bindungsstelle der Ii ähnelt.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe transient transfizierter COS7-Zellen gezeigt werden, dass gB sowohl mit humanen Klasse II-Molekülen verschiedenen Allotyps (DR1, DR3 und DR4) als auch mit Maus Klasse II-Molekülen (IA^k) innerhalb des ERs assoziieren kann. Durch Studien mit Ii/gB-Chimären wurde deutlich, dass die potentielle Bindungsstelle von gB die Funktion der Ii-Klasse II-Bindungsstelle übernehmen kann. Da gB-Deletionskonstrukte (gB Δ 75-92) ohne die potentielle Bindungsstelle noch mit Klasse II-Molekülen assoziieren, sind vermutlich noch weitere Bindungsstellen innerhalb des gBs vorhanden. Die Sequenz, die für die promiskuitive Bindungsstelle (PBS) der Ii kodiert, ist sehr Prolin- und Lysinreich (PKPPKP). Da gB einen hohen Prolinanteil hat, finden sich innerhalb von gB noch einige PBS-ähnliche Motive, die ebenfalls Bindungseigenschaften besitzen könnten.

Das gBs anderer HSV-1 Stämme (KOS, ANGpath) ebenfalls mit Klasse II-Molekülen assoziieren, ist durch die große Homologie zwischen den gBs der verschiedenen HSV-Stämme zu erklären. Es stellt sich nun jedoch die Frage, welche Bedeutung die Assoziation zwischen Klasse II-Molekülen und HSV-1 gB hat?

Die Interaktion zwischen gB und dem HVEM-Rezeptor (Herpes Virus Entry Mediator) auf T-Zellen und lymphoblastoiden B-Zellen führt zum Viruseintritt und somit zur Infektion dieser Zellen. Aber die Nutzung von Klasse II-Molekülen als Rezeptor, konnte bisher nur für das BZLF2-Protein von EBV beobachtet werden, einem 42 kDa Glykoprotein in der EBV-Hüllmembran (Spriggs et al., 1996). Da die vorwiegend von HSV infizierten Epithelzellen normalerweise keine Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, scheidet hier auch das Klasse II-Molekül als Rezeptor für gB aus. Außerdem existieren noch 2 weitere Rezeptorfamilien über die HSV-1 verschiedenste Zelltypen infizieren kann. HCMV-Infektionen hemmen die IFN- γ induzierte Klasse II-Expression auf der Oberfläche von Endothelzellen und Fibroblasten. Eine HSV-Infektion führt zwar zu einer reduzierten

Klasse I-Expression auf der Oberfläche der infizierten Zellen, die Klasse II-Oberflächenexpression ist jedoch nicht verringert. In einigen Studien wurden ein Zusammenhang zwischen HSV-1 und einer induzierten HLA-DR Expression auf infizierten Korneazellen beobachtet (Young und Pepose, 1987; Tang et al., 1993). Hierbei scheint jedoch der Vorteil auf Seiten des Immunsystems zu liegen. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass für die NK-zellvermittelte Lyse von HSV-infizierten Fibroblasten auch HLA-DR exprimierende Zellen benötigt werden (Oh et al., 1987; Howell und Fitzgerald-Bocarsly, 1991). Die Lyse HSV-1 infizierter Makrophagen und Monocyten ist ebenfalls HLA-DR restringiert und wird durch CD4⁺cytotoxische T-Zellen hervorgerufen (Torpey et al., 1989). Mit Hilfe DR-exprimierender HSV-1 infizierter Keratinocyten hat man herausgefunden, dass vorwiegend Epitope aus den Glykoproteinen B, C und D für die Aktivierung cytotoxischer CD4⁺T-Zellen verantwortlich sind (Mikloska und Cunningham, 1998).

4.2 Bindungseigenschaften von gB₇₅₋₉₅

Viele CD8⁺T-Zellepitope sind in früh exprimierten HSV-1 Proteinen lokalisiert. In Mausstudien wurde gezeigt, dass gB auch ein Zielantigen für CD8⁺CTL ist. Das immundominante Epitop gB₄₉₈₋₅₀₅ ist in der Lage 70-90% aller CD8⁺ HSV-1 spezifischen T-Zellen in H-2^b Mäusen zu stimulieren (Wallace et al., 1999). H-2^d restringierte CTLs erkennen Epitope in der immundominanten Region der aa 233-379 von gB (Hanke et al., 1991). Antigene Domänen, die CD4⁺T-Zellepitope enthalten, sind über den gesamten extracytoplasmatischen Teil von gB verteilt und liegen oft innerhalb funktioneller Regionen. In der N-terminalen D1-Domäne (aa 31-220 bei Stamm F), die für den Viruseintritt in die Zelle verantwortlich ist und sowohl die Bindungsstelle für Heparansulfat (aa 68-76) als auch die potentielle Klasse II-Bindungsregion (aa 75-92) beinhaltet, liegen Epitope für neutralisierende Antikörper (Pereira et al., 1989; Qadri et al., 1991; Navarro et al., 1992; Laquerre et al., 1998). Beim Sequenzvergleich verschiedener gB-Stämme fallen -abgesehen von der Signalsequenz- zwei heterologe Bereiche innerhalb der D1-Domäne auf (aa 58-67 und aa 73-79). Gegen diese Bereiche existieren Stammspezifische Antikörper, die nicht mit dem gB des Stammes KOS reagieren. Antikörperresistente Mutanten zeigen, dass jeweils ein Aminosäureaustausch innerhalb dieser Bereiche (aa 62, aa 77, aa 85) die Resistenz gegen neutralisierende Antikörper vermittelt (Kousoulas et al., 1988; Highlander et al., 1989). Der neutralisierende Antikörper B6

bindet an die aa 62-95 und behindert die Viruspenetration und Virusausbreitung von Zelle zu Zelle (Highlander et al., 1988). Die potentielle Klasse II-Bindungsstelle liegt folglich in einer immundominanten Region und bietet Epitope für neutralisierende Antikörper. Deshalb wurde innerhalb dieser Arbeit die Peptid-Bindungseigenschaften von gB₇₅₋₉₅ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das gB-Peptid zwar an verschiedene DR-Allotypen auf der Zelloberfläche binden kann, die Kontrollpeptide aber meist eine bessere Bindung zu den jeweiligen DR-Molekülen aufweisen. Obwohl das gB-Peptid ein Bindungsmotiv für DR1-Moleküle besitzt, zeigt es keine stärkere Bindung zu DR1. Die promiskuitiv bindende Region scheint eine stabilisierende Wirkung auf die Bindung an DR1- und DR3-Moleküle auszuüben. Bei in vivo Experimenten mit gB- und DR1-transfizierten COS-Zellen wurden keine bedeutenden Mengen an SDS-stabilen Klasse II/Peptid-Komplexen nachgewiesen, was eher auf eine schwache Bindung zwischen den generierten gB-Peptiden und DR1-Molekülen schließen lässt. Da COS-Zellen keine APCs sind, verfügen sie wahrscheinlich auch nicht über deren Reservoir an Proteasen. Der Pool antigener gB-Peptide der nach einer Prozessierung in COS-Zellen entsteht, wird sich aller Wahrscheinlichkeit nach von dem in APCs unterscheiden. Es ist daher fraglich, ob das gB-Peptid₇₅₋₉₅ überhaupt bei der Prozessierung in COS-Zellen entsteht.

Damit gB prozessiert werden kann, muss es in die dafür verantwortlichen endosomalen/lysosomalen Kompartimente der Zelle gelangen. Möglicherweise wird gB innerhalb des ERs zurückgehalten. Die Halbwertszeit von gB wird durch die Anwesenheit von DR1 verlängert, was für eine Stabilisierung von gB durch die Bindung an Klasse II-Moleküle spricht. Denkbar ist aber auch ein Transport in andere Kompartimente oder aber direkt zur Zelloberfläche, um der Erzeugung antigener Epitope zu entgehen. Deshalb wurde der Transport von gB näher untersucht.

4.3 Transport von gB in Assoziation mit Klasse II-Molekülen

Die durch Viren verursachte Retention und Degradation von Klasse I-Molekülen ist hinreichend bekannt. Für Klasse II-Moleküle wurde dieses Phänomen bisher nur vereinzelt beobachtet. Das US2-Protein von HCMV ist sowohl für die Degradation von Klasse I-Molekülen als auch für die Degradation der HLA-DR α - und DM α -Kette verantwortlich und beeinflusst dadurch die Antigenpräsentation gegenüber CD4⁺T-Zellen (Tomazin et al., 1999).

Eine andere Studie hat gezeigt, dass nach intraokularer Impfung von BALB/c-Mäusen mit dem HSV-1 Stamm KOS eine intrazelluläre Akkumulation von Klasse II-Molekülen in den APCs der infizierten Hirnregion auftritt (Lewandowski et al., 1993). Ein virales Genprodukt, das für die Stamm-spezifische Akkumulation verantwortlich ist, wurde nicht gefunden. In dieser Arbeit konnte mit transient transfizierten COS7-Zellen und einer Oberflächenbiotinylierung gezeigt werden, dass Klasse II-Moleküle ohne gB und mit gB zur Zelloberfläche gelangen und nicht innerhalb der Zelle zurückgehalten werden. Dass ein geringer Anteil an Klasse II-Molekülen innerhalb der Zelle verbleibt, ist nicht auszuschließen, ihr Einfluss auf die Antigenpräsentation ist jedoch fraglich. Es ist bekannt, dass gB in der Zellmembran infizierter Zellen lokalisiert ist und für die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Auch in transfizierten COS7-Zellen gelangt gB alleine und in Koexpression mit DR1-Molekülen an die Zelloberfläche.

Wird die Glykosylierung von gB verhindert, gelangt es im Gegensatz zu gD und gC nicht an die Zelloberfläche und verhindert somit die Bindung von gB-spezifischen Antikörpern (Glorioso et al., 1983). Das unreife gB assoziiert für längere Zeit mit Calnexin im ER (Yamashita et al., 1996). In gB- und DR-transfizierten COS-Zellen finden sich nach einem chase von 16 Stunden Endo H-resistente Formen von gB, die vollständig glykosyliert sind und somit das ER verlassen haben. Die Zuckerseitenketten im gB haben keinen Einfluss auf die T-Zellerkennung (O'Donnell und Chan, 1991).

gB- und DR-Moleküle werden folglich intrazellulär transportiert und gelangen zur Zelloberfläche transfizierter COS-Zellen. Ein Großteil von Klasse II-Molekülen und ein geringerer Anteil von gB wird auf der Oberfläche exprimiert. In HSV-1 infizierten Zellen verbleibt der Großteil von gB in der perinukleären Membran, die das Virustegument umschließt und somit die Virushülle bildet. In COS-Zellen verlässt gB ebenfalls das ER und verbleibt zum Großteil innerhalb der Zelle. Wahrscheinlich wird der überwiegende Teil von gB in der äußeren Kernmembran zu finden sein. Ob ein Teil von gB in die Prozessierungskompartimente gelangt und die Antigenpräsentation beeinflussen kann, wurde im folgenden untersucht.

4.4 gB kann die Ii in der Antigenpräsentation nicht ersetzen

Da gB ebenso wie die Ii mit Klasse II-Molekülen assoziiert, ist eine Konkurrenz um den gemeinsamen Bindungspartner nicht auszuschließen. Wenn gB die Ii verdrängen kann, wäre auch eine Beeinflussung der Ii-abhängigen Antigenpräsentation denkbar. Mit Hilfe

von Wettbewerbsversuchen konnte gezeigt werden, dass bei einer Koexpression von IA^k , Ii und gB sowohl Ii als auch gB über IA^k kopräzipitiert werden können. Bei erhöhter gB-Expression kann jedoch die Ii als Bindungspartner für IA^k nicht verdrängt werden. Umgekehrt konnte bei zunehmender Ii-Expression auch die Bindung zwischen IA^k und gB nicht gänzlich aufgehoben werden. Dem transienten COS-System wird jedoch durch die Menge der transfizierten DNA Grenzen gesetzt. Da wahrscheinlich noch keine Absättigung der zur Verfügung stehenden Klasse II-Moleküle erreicht wurde, sind ausreichend IA^k -Moleküle vorhanden, die entweder mit Ii oder mit gB assoziieren können. Deshalb wurde der direkte Einfluss von gB auf die Antigenpräsentation untersucht. Mit Hilfe eines Antigenpräsentationsversuches in COS7-Zellen konnte gezeigt werden, dass gB in der Ii-abhängigen Antigenpräsentation des HEL-Peptids₄₈₋₆₁ nicht deren Funktion übernehmen kann. Hierbei unterscheiden sich auch nicht die gBs verschiedener HSV-1 Stämme. Lediglich die Ii/gB-Chimäre ist in der Lage, die Präsentation des HEL-Peptids₄₈₋₆₁ zu ermöglichen. Ob gB selbst für die mangelnde Antigenpräsentation verantwortlich ist oder nur die fehlende Ii, müsste noch in einer Kotransfektion von Ii und gB getestet werden.

Es konnten also bisher keine Hinweise dafür gefunden werden, dass sich gB durch die Assoziation mit Klasse II-Molekülen einen Vorteil gegenüber dem Immunsystem verschafft, obwohl Klasse II-Moleküle für die Präsentation zahlreicher gB-Epitope verantwortlich sind.

4.5 gBs verschiedener HSV-1 Stämme assoziieren mit humanen und Maus Klasse II-Molekülen

In Mausinfektionsversuchen konnte gezeigt werden, dass verschiedene HSV-1 Stämme innerhalb eines Maus-Haplotyps einen unterschiedlichen Krankheitsverlauf zeigen. HSV-1 Stamm KOS verursacht nach intraokularer Impfung in BALB/c-Mäusen ($H-2^b$) eine tödlich verlaufende Infektion, wohingegen der Stamm F nur eine latente Infektion des Gehirns verursacht (Lewandowski et al., 1993). Aus einem ursprünglich nicht pathogenem HSV-1 Stamm ANG ist nach mehreren intrazerebralen Passagen ein pathogener Stamm ANGpath entstanden, der DBA/2-Mäuse ($H-2^d$) nach intraperitonealer Infektion bereits in geringen Mengen tötet (Kaerner et al., 1983). Im Gegensatz zu dem pathogenen Stamm ANGpath verläuft eine Infektion mit dem Stamm HSZP in adulten DBA/2-Mäusen niemals tödlich (Rajčáni et al., 1996). In DBA/2-Mäusen wiederum zeigt der HSV-1

Stamm KOS nur eine geringe Pathogenität im Gegensatz zum Stamm ANGpath (Košťál et al., 1994). Wie anhand dieser Beispiele deutlich wird, zeigen nicht nur unterschiedliche HSV-1 Stämme verschiedene Virulenzen, sondern auch die Maus-Inzuchtstämme unterscheiden sich in ihrer Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen HSV-1 Stämmen. Während C57BL/6-Mäuse (H-2^b) resistent gegen verschiedene HSV-1 Stämme sind, zählen DBA- (H-2^d), AKR-(H-2^k) und BALB/c-Mäuse (H-2^d) zu den empfindlichen Inzuchtstämmen (Lopez et al., 1975).

Welche Faktoren zu einer Neuroinvasion, also einer Ausbreitung über das ganze Gehirn und somit zu einer Enzephalitis führen, sind nicht genau bekannt. Im Mausmodell konnte jedoch gezeigt werden, dass gB und gD die Neuroinvasion beeinflussen. Die Stämme ANG und KOS zeigen in Mäusen keine Neuroinvasion, das heißt sie vermehren sich nur innerhalb der Ganglien und peripheren Nerven sowie am primären Infektionsort im Körper. Ein einzelner Aminosäureaustausch in gD und gB führt zur Neuroinvasion (Izumi und Stevens, 1990; Yuhasz und Stevens, 1993). Viele Mausstudien haben auch gezeigt, dass gemischte Infektionen mit verschiedenen HSV-1 Stämmen zu einem schwereren Krankheitsverlauf führen. Es finden sowohl Komplementations- als auch Rekombinationsereignisse statt, die zu rekombinanten Stämmen mit einer größeren Virulenz führen. Auch hierbei scheint gB eine Rolle zu spielen (Lingen et al., 1997). Der Austausch von gB eines pathogenen Stammes (ANGpath) gegen das gB eines nicht-pathogenen Stammes KOS resultiert in einem rekombinanten Virus mit verringerter Pathogenität (Kostal et al., 1994).

Diese verschiedenen Beispiele machen deutlich, dass gB sehr wichtig für die Pathogenität des Virus ist. Substitutionen einzelner Aminosäuren im gB haben enorme Auswirkungen auf das gesamte Virus. Sie beeinflussen nicht nur die Neuroinvasion, sondern auch die Viruseintrittsrates und die Syncytium-Bildung und somit die Virusausbreitung. Mutationen im gB können sich also direkt auf die Pathogenität auswirken. Beim Sequenzvergleich der gB-Sequenzen von pathogenen (ANGpath, 17) und nicht-pathogenen HSV-Stämmen (KOS, HSZP) zeigten sich vor allem Unterschiede in der antigenen Domäne D1 (zwischen aa 59-79). Diese Mutationen können direkt Auswirkung auf die Bindung neutralisierender Antikörper haben. Möglicherweise führen Mutationen innerhalb antigenen Domänen jedoch auch zu einer höheren Immunogenität der entsprechenden Epitope, was wiederum zu einer verminderten Pathogenität des Virus beiträgt (Košovský et al., 2000).

Nicht nur der HSV-Stamm sondern auch der Haplotyp des Wirtes korreliert mit der Pathogenität von HSV-1. Das gB-Epitop gB₄₉₈₋₅₀₅ wird beispielsweise nicht von jedem

Haplotyp und jedem Klasse I-Allotyp präsentiert. Lediglich in H-2^b- (C57BL/6) und H-2^d-Mäusen (BALB/c) gilt gB als Zielantigen für CTLs, nicht in H-2^k-Mäusen (CBA/J). Dabei assoziieren nur K^b-Moleküle mit gB₄₉₈₋₅₀₅ und nicht D^b-Moleküle (Hanke et al., 1991). Im humanen Zellsystem sind vor allem HLA-DR Moleküle für die Präsentation von HSV-gB-Epitopen verantwortlich. Der Virus-Antikörpertiter nach HSV-1-, EBV- und CMV-Infektionen ist in HLA-DR2 positiven Menschen erhöht (Lio et al., 1994). Auch bei anderen Virusinfektionen konnte ein Zusammenhang zwischen dem MHC-Haplotyp und einer stärkeren Virusabwehr festgestellt werden. Bei HIV-Infektionen bietet das HLA-Bw4 Allel einen besseren Schutz vor AIDS (Flores-Villanueva et al., 2001). Bei Hepatitis C-Infektionen ist das DR11-Allel für die Präsentation einiger immundominanter CD4⁺-Epitope verantwortlich (Godkin et al., 2001).

Die große Homologie zwischen den gBs verschiedener Herpesviren führt auch zu kreuzreaktiven T-Zell-Epitopen. Die T-Zellreaktivität gegen HSV-gB hängt vom HLA-Haplotyp und von der Kombination anderer Herpesviren ab, die das Individuum zuvor infiziert haben. So zeigen beispielsweise Individuen mit einer starken T-Zellantwort gegen das Varizella-Zoster-Virus und dem HLA-Haplotyp A2, B7, DR2 und DQw1 auch eine starke Immunantwort gegen kreuzreaktive gB-Fragmente (Chan et al., 1989).

Die Faktoren, die nach einer HSV-1 Infektion des Menschen zu einer Enzephalitis führen, sind noch nicht bekannt. Außer gB sind noch andere Virus- und Wirtsfaktoren (Immunstatus, HLA-Haplotyp, Koinfektionen) für die Neuropathogenität verantwortlich.

Ein näherer Zusammenhang zwischen HLA-DR1 und HSV-gB konnte innerhalb dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Ob die Assoziation mit verschiedenen Klasse II-Molekülen einen Vorteil für das Virus bietet, konnte nicht geklärt werden. Sicherlich wäre eine Überprüfung der Assoziation von Klasse II und anderen HSV-1 Glykoproteinen sinnvoll. Eine spezifische Assoziation mit gB würde für die Relevanz dieses Phänomens sprechen, dessen Bedeutung in der Immunabwehr noch zu klären wäre.

5. Zusammenfassung

Das menschliche Immunsystem wird ständig durch virale Infektionen herausgefordert und setzt verschiedene Effektorreaktionen zur Abwehr ein. Obwohl die humanpathogenen Viren untereinander sehr verschieden sind, haben sie ähnliche Mechanismen entwickelt, um diesen Effektorreaktionen zu entgehen. Bei den humanpathogenen Herpesviren sind verschiedene Strategien bekannt, die die Antigenpräsentation gegenüber $CD8^+$ T-Zellen hemmen. Dagegen wurden bisher nur wenige virale Mechanismen beschrieben, die die Antigenpräsentation gegenüber $CD4^+$ T-Zellen beeinflussen. Dennoch verhindern neutralisierende Antikörper nach einer Reaktivierung von persistierenden Herpesviren deren Ausbreitung im Körper. Wir haben in dem Glykoprotein B (gB) des Herpes Simplex Virus Typ1 (HSV-1) eine Sequenz von 6 Aminosäuren entdeckt, die identisch zu einer Sequenz innerhalb der humanen Invarianten Kette (Ii) ist. Über diese Sequenz bindet die Invariante Kette promiskuitiv an verschiedene MHC Klasse II-Allotypen. An die Sequenz im Glykoprotein B grenzt C-terminal ein HLA-DR1 Bindungsmotiv, wodurch die Virussequenz der MHC Klasse II-Bindungsstelle der Invarianten Kette ähnelt. Zwischen dem viralen Glykoprotein B und MHC Klasse II-Molekülen verschiedenen Allotyps und unterschiedlicher Spezies konnte eine Interaktion gezeigt werden. In Chimären der Invarianten Kette mit gB-Sequenzen kann die potentielle MHC Klasse II-Bindungsstelle von Glykoprotein B die Klasse II-Bindungsstelle der Invarianten Kette ersetzen. Eine Assoziation zwischen MHC Klasse II-Molekülen und gB-Deletionskonstrukten weist auf zusätzliche MHC Klasse II-Bindungsstellen innerhalb des Glykoproteins B hin. Sowohl Glykoprotein B als auch MHC Klasse II-Moleküle verlassen das ER und werden posttranslational modifiziert. Die MHC Klasse II-Moleküle gelangen zur Zelloberfläche, wo auch ein Teil von Glykoprotein B exprimiert wird. Das intrazellulär verbleibende Glykoprotein B kann die Invariante Kette bei der Ii-abhängigen Antigenpräsentation nicht ersetzen. Die hoch konservierten Glykoproteine B verschiedener HSV-1 Stämme, die für deren unterschiedliche Pathogenität in Mäusen mitverantwortlich sind, zeigen weder Unterschiede in der Assoziation zu MHC Klasse II-Molekülen noch in der Ii-abhängigen Antigenpräsentation. Das für die Infektiosität und Virusausbreitung wichtige Glykoprotein B liefert dem Immunsystem dominante $CD4^+$ -Epitope. Möglicherweise kann Glykoprotein B über die Assoziation mit Klasse II-Molekülen in die MHC II-Prozessierungskompartimente gelangen und die Prozessierung innerhalb dieser Kompartimente beeinflussen. Denkbar ist auch ein veränderter intrazellulärer Transport, bei dem das Glykoprotein B dem MHC II-Prozessierungsweg entgeht.

6. Literatur

- Ahmed R. and Biron C.A., 1999. Immunity to Viruses. *Fundamental Immunology* 4th ed, edited by W.E. Paul. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 1295-1334.
- Ahmed R., Butler L.D. and Bhatti L., 1988. T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J. Virol.* **62**:2102-2106.
- Ahn K., Gruhler A., Galocha B., Jones T.R., Wiertz E.J., Ploegh H.L., Peterson P.A., Yang Y. and Früh K., 1997. The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**:613-621.
- Ahn K., Meyer T.H., Uebel S., Sempé P., Djaballah H., Yang Y., Peterson P.A., Früh K. and Tampé R., 1996. Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus protein ICP47. *EMBO J.* **15**:3247-3255.
- Alcami A. and Koszinowski U.H., 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunology Today* Vol. 21, **9**: 447-455.
- Alcami A. and Smith G.L., 1995. Vaccinia, cowpox, and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. *J. Virol.* **69**:762-769.
- Ali M.A., 1990. Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B occurs in the endoplasmic reticulum and a 102 amino acid cytoplasmic domain is dispensable for dimer assembly. *Virology* **178**:588-592.
- Alonso K., Pontiggia P., Medenica R. and Rizzo S., 1997. Cytokine patterns in adults with AIDS. *Immunol. Invest.* **26**:341-350.
- Aman P., and von Gabain A., 1990. An Epstein-Barr virus immortalization associated gene segment interferes specifically with the IFN-induced anti-proliferative response in human B-lymphoid cell lines. *EMBO J.* **9**:147-152.
- Amigorena S., Drake J.R., Webster P. and Mellman I., 1994. Transient accumulation of new class II molecules in a novel endocytic compartment in B lymphocytes. *Nature* **369**:113-120.
- Amigorena S., Webster P., Drake J., Newcomb J., Cresswell P. and Mellman I., 1995. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med.* **181**:1729-1741.
- Anderson K.S. and Cresswell P., 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO* **13**(3):675-82.
- Andresson T., Sparkowski J., Goldstein D.J. and Schlegel R., 1995. Vacuolar H(+)-ATPase mutants transform cells and define a binding site for the papillomavirus E5 oncoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**:6830-37.
- Ashman J.B. and Miller J., 1999. A Role for the Transmembrane Domain in the Trimerization of the MHC Class II-Associated Invariant Chain. *J. Immunology* **163**:2704-2712.
- Atherton A., Armour K.L., Bell S., Minson A.C. and Clark M.R., 2000. The herpes simplex virus type 1 Fc receptor discriminates between IgG1 allotypes. *Eur. J. Immunol.* **20**:2540-2547.
- Bakke O. and Dobberstein B., 1990. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* **63**:707-716.
- Barcy S. and Corey L., 2001. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4⁺ T cells. *J. Immunol.* **166**:6242-6249.

- Beck S. and Barrell B.G., 1988. Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* **331**:269-272.
- Becker Y. and Darai G., 1994. Pathogenicity of Human Herpesviruses due to Specific Pathogenicity Genes. *Frontiers of Virology* 3, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest.
- Berke G., 1994. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular targets. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:735-773.
- Bertolino P., Forquet F., Pont S., Koch N., Gerlier D. and Rabourdin-Combe C., 1991. Correlation between invariant chain expression level and capability to present antigen to MHC class II-restricted T cells. *Int. Immunol.* **3**:435-443.
- Bijlmakers M.J., Benaroch P. and Ploegh H.L., 1994. Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J. Exp. Med.* **180**:623-629.
- Bikhoff E.K., Germain R.N. and Robertson E.J., 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* **2**:301-310.
- Bikhoff E.K., Huang L.Y., Episkopou V., Meerwijk J., Germain R.N. and Robertson E.J., 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition and CD4⁺ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med.* **177**:1699-1712.
- Biron C.A., 1994. Cytokines in the generation of immune responses to and resolution of virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* **6**:530-538.
- Biron C.A., 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:24-34.
- Blacklaws B.A., Krishna S., Minson A.C. and Nash A.A., 1990. Immunogenicity of Herpes simplex virus type 1 glycoproteins expressed in Vaccinia virus recombinants. *Virology* **177**:727-36.
- Blum J.S. and Cresswell P., 1988. Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:3975-3979.
- Boehmer P.E. and Lehman I.R., 1997. Herpes Simplex Virus DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:347-84.
- Bond V.C., Person S. and Warner S.C., 1982. The isolation and characterization of mutants of herpes simplex virus type 1 that induce cell fusion. *J. Gen. Virol.* **61**:245-254.
- Bonneau R.H. and Jennings S.R., 1989. Modulation of acute and latent herpes simplex virus infection in C57BL/6 mice by adoptive transfer of immune lymphocytes with cytolytic activity. *J. Virol.* **63**:1480-1484.
- Bonner W.M. and Laskey R.A., 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46**:83-88.
- Bonnerot C., Marks M.S., Cosson P., Robertson E.J., Bikoff E.K., Germain R.N. and Bonifacino J.S., 1994. Association with BiP and aggregation of class II MHC molecules synthesized in the absence of invariant chain. *EMBO J.* **13**:934-944.
- Brown A.M., Barr C.L. and Ting J.P., 1991b. Sequences homologous to class II MHC W, X and Y elements mediate constitutive and IFN-gamma-induced expression of human class II-associated invariant chain gene. *J. Immunol.* **146**:3183-3189.
- Brown A.M., Driscoll J. and Monaco J.J., 1991a. Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* **353**:355-357.

- Browne H., Bruun B. and Minson T., 2001. Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *J. Gen. Virol.* **82**:1419-1422.
- Burysek L., Yeow W.S. and Pitha P.M., 1999. Unique properties of a second human herpesvirus 8-encoded interferon regulatory factor (vIRF-2). *J. Hum. Virol.* **2**:19-32.
- Busch R., Vturina I.Y., Drexler J., Momburg F. and Hämmerling G.J., 1995. Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur. J. Immunol.* **25**:48-53.
- Bustos J. and Gómez B., 1999. Characteristics of a Macrophage Culture Persistently Infected with Herpes Simplex Virus Type 1. *Arch. Med. Res.* **30**:255-262.
- Bystricka M., Petrikova M., Zatovicova M., Solarikova L., Kostolansky F., Mucha V. and Russ G., 1997. Monoclonal antibodies to the distinct antigenic sites on glycoproteins C and B and their protective abilities in herpes simplex virus infection. *Acta virologica* **41**:5-12.
- Bzik D.J., Fox B.A., DeLuca N.A. and Person S., 1984. Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* **137**:185-190.
- Cafruny W.A. and Bradley S.E., 1996. Trojan Horse macrophages: studies with the murine lactate dehydrogenase-elevating virus and implications for sexually transmitted infection. *J. Gen. Virol.* **77**:3005-3012.
- Cai W., Gu B. and Person S., 1988a. Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion. *J. Virol.* **62**:2596-2604.
- Cai W.Z., Person S., Debroy C. and Gu B.H., 1988 b. Functional regions and structural features of the gB glycoprotein of herpes simplex virus type 1. *J. Molec. Biol.* **201**:575-88.
- Campadelli-Fiume G., Cocchi F., Menotti L. and Lopez M., 2000. The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev. Med. Virol.* **10**:305-319.
- Cantin E.M., Eberle R., Baldick J.L., Moss B., Willey D.E., Notkins A.L. and Openshaw, H., 1987. Expression of Herpes simplex virus 1 glycoprotein B by a recombinant Vaccinia virus and protection of mice against against later Herpes simplex virus 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5908-12.
- Cardin R.D., Brooks J.W., Sarawar S.R. and Doherty P.C., 1996. Progressive loss of CD8+ T cell-mediated control of a gamma-herpesvirus in the absence of CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **184**:863-871.
- Castellino F., Han R. and Germain R.N., 2001. The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur. J. Immunol.* **31**:841-850.
- Ceman S. and Sant A.J., 1995. The function of invariant chain in class II-restricted antigen presentation. *Immunology* **7**:373-387.
- Chan W.-L., Tizard M.L.V. and Faulkner L., 1989. Proliferative T-cell response to glycoprotein B of the human herpesviruses: the influence of MHC and sequence of infection on the pattern of cross-reactivity. *Immunology* **68**: 96-101.
- Cheng E.H., Nicholas J., Bellows D.S., Hayward G.S., Guo H.G., Reitz M.S. and Hardwick J.M., 1997. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**:690-694.
- Chicz R.M., Urban R.G., Gorga J.C, Vignali D.A., Lane W.S. and Strominger J.L., 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* **178**:27.
- Claesson L. and Peterson P.A., 1983. Association of human γ chain with class II transplantation antigens during intracellular transport. *Biochemistry* **22**:3206-3213.

- Claesson L., Larhammar D., Rask L. and Peterson P.A., 1983. cDNA clone for the human invariant chain of class II histocompatibility antigens and its implication for the protein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7395-7399.
- Claesson-Welsh L. and Spear P.G., 1986. Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B. *J. Virol.* **60**:803-806.
- Cocchi F., Menotti L., Mirandola P. et al., 1998. The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin superfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a *bonafide* receptor for herpes simplex viruses 1 and 2 in human cells. *J. Virol.* **72**:9992-10002.
- Colonna M., 1996. Natural killer cell receptors specific for MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:101-107.
- Cose S.C., Jones C.M., Wallace M.E., Heath W.R. and Carbone F.R., 1997. Antigen-specific CD8⁺ T cell subset distribution in lymph nodes draining the site of herpes simplex virus infection. *Eur. J. Immunol.* **27**:2310-2316.
- Cosgrove D., Gray D., Dierich A., Kaufmann J., Lemeur M., Benoist C. and Mathis D., 1991. Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* **66**:1051-1066.
- Coutelier J.P., Coulie P.G., Wauters P., Heremans H. and van der Logt J.T., 1990. In vivo polyclonal B-lymphocyte activation elicited by murine viruses. *J. Virol.* **64**:5383-5388.
- Cresswell P., 1994. Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:259-293.
- Darlington R.W. and Moss L.H., 1986. Herpesvirus envelopment. *J. Virol.* **2**:48-55.
- Denzin L.K. and Cresswell P., 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* **82**:155.
- Denzin L.K., Hammond C. and Cresswell P., 1996. HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J. Exp. Med.* **184**:2153-2165.
- Desai P.J., Schaffer P.A. and Minson A.C., 1988. Excretion of non-infectious virus particles lacking glycoprotein H by a temperature-sensitive mutant of herpes simplex virus type 1: evidence that gH is essential for virion infectivity. *J. Gen. Virol.* **69**:1147-1156.
- Deshpande S.P., Kumaraguru U and Rouse B.T., 2000. Dual Role of B Cells in Mediating Innate and Acquired Immunity to Herpes Simplex Virus Infections. *Cellular Immunology* **202**:79-87.
- Deveraux Q.L. and Reed J.C., 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* **13**:239-252.
- Doherty P.C., Topham D.J., Tripp R.A., Cardin R.D., Brooks J.W. and Stevenson P.G., 1997. Effector CD4⁺ and CD8⁺ T-cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol. Rev.* **159**:105-117.
- Dower W.J., Miller J.F. and Ragsdale C.W., 1988. High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. *Nucl. Acid. Res.* **16**:6127-6145.
- Dubin G., Socolof E., Frank I. and Friedman H.M., 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Virol.* **65**:7046-7050.
- Eling D.J., Johnson P.A., Sharma S. and Kipps T.J., 2000. Chronic lymphocytic leukemia B cells are highly sensitive to infection by herpes simplex virus-1 via herpesvirus-entry-mediator A. *Gene Therapy* **7**:1210-1216.

- Elliott E.A., Drake J.R., Amigorena S., Elsemore J., Webster P., Mellman I. and Flavell R.A., 1994. The invariant chain is required for intracellular transport and function of major histocompatibility complex class II molecules. *J. Exp. Med.* **179**:681-694.
- Elsing A. and Burgert H.G., 1998. The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins downmodulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10072-77.
- Farrell H.E., Vally H., Lynch D.M., Flemming P., Shellam G.R., Scalzo A.A. and Davis-Poynter N.J., 1997. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue *in vivo*. *Nature* **386**:510-514.
- Flores-Villanueva P. O., Yunis E.J., Delgado J.C et.al., 2001. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:5140-5145.
- Forrester A., Farrell H., Wilkinson G., Kaye J., Davis-Poynter N. and Minson T., 1992. Construction and Properties of a Mutant of Herpes Simplex Virus Type 1 with Glycoprotein H Coding Sequences Deleted. *J. Virol.* **66**:341-348.
- Foster T.P., Melancon J.M. and Kousoulas K.G., 2001. An alpha-helical domain within the carboxyl terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB) is associated with cell fusion and resistance to heparin inhibition of cell fusion. *Virology* **287**(1):18-29.
- Frank I. and Friedman H.M., 1989. A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *J. Virol.* **63**:4479-4488.
- Freisewinkel I.M., 1995. Die Assoziation der MHC Klasse II Moleküle mit der Invarianten Kette. Dissertation, Bonn.
- Freisewinkel I.M., Schenck K. and Koch N., 1993. The segment of invariant chain that is critical for association with major histocompatibility complex class II molecules contains the sequence of a peptide eluted from class II polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:9703-9706.
- Friedman H.M., Wang L., Fishman N.O., Lambris J.D., Eisenberg R.J., Cohen G.H. and Lubinski J., 1996. Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J. Virol.* **70**:4253-4260.
- Friedman H.M., Wang L., Pangburn M.K., Lambris J.D. and Lubinski J., 2000. Novel mechanism of antibody-independent complement neutralization of herpes simplex virus type 1. *J. Immunol.* **165**:4528-4536.
- Früh K., Ahn K., Djaballah H., Sempe P., van Endert P.M., Tampe R., Peterson P.A. and Yang Y., 1995. A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* **375**:415-418.
- Fuller A.O. and Lee W.-C., 1992. Herpes simplex virus type 1 entry through a cascade of virus-cell interactions requires different roles of gD and gH in penetration. *J. Virol.* **66**:5002-5012.
- Fung-Leung W.-P., Surth C.D., Liljedahl M., Pang J., Leturcq D., Peterson P.A., Webb S.R. and Karlsson L., 1996. Antigen presentation and T cell development in H-2M-deficient mice. *Science* **271**:1278-1281.
- Gage P.J., Levine M. and Glorioso J.C., 1993. Syncytium-inducing mutations localize to two discrete regions within the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *J. Virol.* **67**:2191-2201.
- Galocha B., Hill A., Barnett B.C., Dolan A., Raimondi A., Cook R.F., Brunner J., McGeoch D.J. and Ploegh H.L., 1997. The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH₂-terminal 35 residues. *J. Exp. Med.* **185**:1565-1572.
- Georges B., Loing E., Neveu R., Melnyk O., Gras-Masse H. and Auriault C., 2000. Structural diversity of human class II histocompatibility molecules induced by peptide ligands. *FEBS Letters* **481**:249-254.

- Geraghty R.J., Jogger C.R. and Spear P.G., 2000. Cellular expression of alphaherpesvirus gD interferes with entry of homologous and heterologous alphaherpesviruses by blocking access to a shared gD receptor. *Virology* **268**:147-158.
- Geraghty R.J., Krummenacher C., Cohen G.H. et al., 1998. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280**:1618-1620.
- Germain R.N. and Margulies D.H., 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:403-450.
- Gewurz B.E., Gaudet R., Tortorella D., Wang E.W. and Ploegh H.L., 2001. Virus subversion of immunity: a structural perspective. *Curr. Opin. Immunol.* **13**:442-450.
- Ghiasi H., Cai S., Nesburn A.B. and Wechsler S.L., 1997. MHC-II but not MHC-I responses are required for vaccine-induced protection against ocular challenge with HSV-1. *Curr. Eye Res.* **16**:1152-1158.
- Ghiasi H., Kaiwar R. Nesburn A.B. and Wechsler S.L., 1992. Expression of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein B in insect cells. Initial analysis of its biochemical and immunological properties. *Virus Res.* **22**:25-39.
- Ghosh P., Amaya M., Mellins E. and Wiley D.C., 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* **378**:457.
- Gidlund M., Örn A., Wigzell H., Senik A. and Gresser I., 1978. Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* **273**:759-761.
- Gilbert R., Ghosh K., Rasile L. and Ghosh H.P., 1994. Membrane anchoring domain of herpes simplex virus glycoprotein gB is sufficient for nuclear envelope localization. *J. Virol.* **68**:2272-2285.
- Glorioso J., Szczesiul M.S, Marlin S.D. and Levine M., 1983. Inhibition of glycosylation of herpes simplex virus glycoproteins: identification of antigenic and immunogenic partially glycosylated glycopeptides on the cell surface membrane. *Virology* **126**: 1-18.
- Godkin, A., Jeanguet N., Thursz M., Openshaw P. and Thomas, H., 2001. Characterization of novel HLA-DR11-restricted HCV epitopes reveals both qualitative and quantitative differences in HCV-specific CD4⁺ T cell responses in chronically infected and non-viremic patients. *Eur. J. Immunol.* **31**: 1438-46.
- Goldsmith K., Chen W., Johnson D.C. and Hendricks R.L., 1998. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8⁺ T cell response. *J. Exp. Med.* **187**:341-348.
- Gorbach S.I., Bartlett J.G. and Blacklow N.R., 1992. *Infectious Diseases*; W.B. Saunders Company.
- Gruenheid S., Gatzke L., Meadows H. et al., 1993. Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* **67**:93-100.
- Hammer J., Valsasini P., Tolba K., Bolin D., Higelin J., Takacs B. and Sinigaglia F., 1993. Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR binding peptides. *Cell* **74**:197-203.
- Hanahan D., 1985. Techniques for transformation of E.coli. In: DNA cloning, Vol II (Ed. D. M. Glover): 109-135. IRL Press Limited, Oxford, England.
- Hanke T., Graham F.L., Rosenthal K.L. and Johnson D.C., 1991. Identification of an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte recognition site in glycoprotein B of herpes simplex virus by using recombinant adenovirus vectors and synthetic peptides. *J. Virol.* **65**:1177-1186.
- Harding C.V., France J., Song R., Farah J.M., Chatterjee S., Iqbal M. and Siman R., 1995. Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block MHC-I antigen-processing pathway. *J. Immunol.* **155**:1767-1775.

- He B., Gross M. and Roizman B., 1997. The gamma 34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1 alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**:843-848.
- Henderson S., Huen D., Rowe M., Dawson C., Johnson G. and Rickinson A., 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **90**:8479-83.
- Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E. and Rickinson A., 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* **65**:1107-1115.
- Hengel H., Flohr T., Hämmerling G.J., Koszinowski U.H. and Momburg F., 1996. Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmic reticulum for MHC class I assembly. *J. Gen. Virol.* **77**:2287-2296.
- Hengel H., Koopmann J.O., Flohr T., Muranyi W., Goulmy E., Hämmerling G.J., Koszinowski U.H. and Momburg F., 1997. A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* **6**:623-632.
- Herold B.C., Visalli R.J., Susmarski N. et al., 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* **75**:1211-1222.
- Herold B.C., WuDunn D., Soltys N. et al., 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J. Virol.* **65**:1090-1098.
- Highlander S.L., Cai W.H., Person S., Levine M. and Glorioso J.C., 1988. Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *J. Virol.* **62**:1881-8.
- Highlander S.L., Dorney D.J., Gage P.J., Holland T.C., Cai W.H., Person S., Levine M. and Glorioso J.C., 1989. Identification of mar mutations in herpes simplex virus type 1 glycoprotein B which alter antigenic structure and function of virus penetration. *J. Virol.* **63**: 730-8.
- Highlander S.L., Goins W.F., Person S., Holland T.C., Levine M. and Glorioso J.C., 1991. Oligomer formation of the gB glycoprotein of herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **65**:4275-4283.
- Hill A., Jugovic P., York I., Russ G., Bennink J., Yewdell J., Ploegh H. and Johnson D., 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**:411-415.
- Hill A.B., Barnett B.C., McMichael A.J. and McGeoch D.J., 1994. HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Immunol.* **152**:2736-2741.
- Hitzel C., van Endert P. and Koch N., 1995. Acquisition of peptides by MHC class II polypeptides in the absence of the invariant chain. *J. Immunol.* **154**:1048-1056.
- Howell D.M. and Fitzgerald-Bocarsly P., 1991. Natural killer-mediated lysis of some but not all HSV-1 or VSV-infected targets requires the participation of HLA-DR-positive accessory cells. *Immunology* **72**: 443-7.
- Hu F.Q., Smith C.A. and Pickup D.J., 1994. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the type II TNF receptor. *Virology* **204**:343-356.
- Hutchinson L., Browne H., Wargent V., Davis-Poynter N., Primorac S., Goldsmith K., Minson A.C. and Johnson D.C., 1992. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J. Virol.* **66**:2240-2250.
- Ito M., Watanabe M., Kamiya H. and Sakurai M., 1997. Herpes simplex virus type 1 induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes. *J. Infect. Dis.* **175**(5):1220-4.

- Johnson D.C., Frame M.C., Ligas M.W., Cross A.M. and Stow N.D., 1988. Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *J. Virol.* **62**:1347-1354.
- Jones C.M., Cose S.C., Coles R.M., Winterhalter A.C., Brooks A.G., Heath W.R. and Carbone F.R., 2000. Herpes Simplex Virus Type 1-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte Arming Occurs within Lymph Nodes Draining the Site of Cutaneous Infection. *J. Virol.* **74**:2414-2419.
- Jones P.P., Murphy D.B., Hewgill D. and McDevitt H.O., 1979. Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E subregion immunoprecipitates. *Mol. Immunol.* **16**:51-60.
- Jones T.R., Wiertz E.J., Sun L., Fish K.N., Nelson J.A. and Ploegh H.L., 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11327-33.
- Kaerner H.C., Schröder C.H., Ott-Hartmann A., Kümel G. and Kirchner H., 1989. Genetic variability of herpes simplex virus: development of pathogenic variant during passaging of a non-pathogenic herpes simplex virus type 1 virus strain in mouse brain. *J. Virol.* **46**: 83-93.
- Kagi D., Vignaux F. and Ledermann B., 1994. Fas and perforin pathways as a major mechanisms of T-cell mediated cytotoxicity. *Science* **265**:528-530.
- Karp C.L., Wysocka M., Wahl L.M., Ahearn J.M., Cuomo P.J., Sherry B., Trinchieri G. and Griffin D.E., 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science* **273**:228-231. Erratum 1997 *Science* **275**:1053.
- Karupiah G., Xie Q.W., Buller R.M., Nathan C., Duarte C. and MacMicking J.D., 1993. Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase. *Science* **261**:1445-1448.
- Kerkau T., Bacik I., Bennink J.R., Yewdell J.W., Hunig T., Schimpl A. and Schubert U., 1997. The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J. Exp. Med.* **185**:1295-1305.
- Koch N. and Hämmerling G.J., 1985. Ia-associated invariant chain is fatty acylated before addition of sialic acid. *Biochemistry* **24**:6185-6190.
- Koch N., Hämmerling G.J., Szymura J. and Wabl M.R., 1982. Ia associated Ii chain is not encoded by chromosome 17 of the mouse. *Immunogenetics* **16**:603-606.
- Koch N., Lauer W., Habicht J. and Dobberstein B., 1987. Primary structure of the gene for the murine Ia antigen-associated invariant chains (Ii). An alternatively spliced exon encodes a cysteine-rich domain highly homologous to a repetitive sequence of thyroglobulin. *EMBO J.* **6**:1677-1683.
- Koch N., Wong G.H.W. and Schrader J.W., 1984. Ia antigens and associated invariant chain are induced simultaneously in lines T-dependent mast cells by recombinant interferon γ . *J. Immunol.* **132**:1361-1369.
- Kodukula P., Liu T., Rooijen N.V., Jager M.J. and Hendricks R.L., 1999. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J. Immunol.* **162**:2895-2905.
- Kolaitis G., Doymaz M. and Rouse B.T., 1990. Demonstration of MHC class II-restricted cytotoxic T lymphocytes in mice against herpes simplex virus. *Immunology* **71**:101-106.
- Kosovsky J., Vojvodova A., Oravcova I., Kudelova M., Matis J. and Rajcani J., 2000. Herpes simplex virus 1 (HSV-1) strain HSZP glycoprotein B gene: comparison of mutations among strains differing in virulence. *Virus Genes* **20**: 27-33.
- Koštal M., Bacik I., Rajčáni J. and Kaerner H.C., 1994. Replacement of glycoprotein B gene in the herpes simplex virus type 1 strain ANGpath DNA by that originating from nonpathogenic strain KOS reduces the pathogenicity of recombinant virus. *Acta virologica* **38**:77-88.

- Kostavasili I., Sahu A., Friedman H.M., Eisenberg R.J., Cohen G.H. and Lambris J.D., 1997. Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J. Immunol.* **158**:1763-1771.
- Kotwal G.J., Isaacs S.N., McKenzie R., Frank M.M. and Moss B., 1990. Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of vaccinia virus. *Science* **250**:827-830.
- Kousoulas K.G., Huo B. and Pereira L., 1988. Antibody-resistant mutations in cross-reactive and type-specific epitopes of herpes simplex virus 1 glycoprotein B map in separate domains. *Virology* **166**: 423-31.
- Kropshofer H., Vogt A.B., Moldenhauer G., Hammer J., Blum J.S. and Hämmerling G.J., 1996. Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J.* **15**:6144-6154.
- Krummenacher C., Nicola A.V., Whitbeck J.C. et al., 1998. Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. *J. Virol.* **72**:7064-7074.
- Kruse M., Rosorius O., Krätzer F., Stelz G., Kuhnt C., Schuler G., Hauber J. and Steinkasserer A., 2000. Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J. Virol.* **74**:7127-7136.
- Kulesar G., Dan P., Nasz J., Csata S., L'vov N.D., Barinskii I.F. and Posevaia T.A., 1990. Persistence of herpes simplex virus and adenovirus in lymphocytes of patients with urogenital tumors. *Vopr. Virusol.* **35**:50.
- Kvist S., Wiman K., Claesson L., Peterson P.A. and Dobberstein B., 1982. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* **29**:61-69.
- Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lalani A.S., Masters J., Graham K., Liu L., Lucas A. and McFadden G., 1999. Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology* **256**:233-245.
- Lamb C.A. and Cresswell P., 1992. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* **148**:3478-3482.
- Lamb C.A., Yewdell J.W., Bennink J.R. and Cresswell P., 1991. Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:5998-6002.
- Lanier L.L., 1997. Natural killer cell receptors and MHC class I interactions. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:126-131.
- Lanier L.L., Gutman G.A., Lewis D.E., Griswold S.T. and Warner N.L., 1982. Monoclonal antibodies against rat immunoglobulin kappa chains. *Hybridoma* **1**:125-131.
- Laquerre S., Argnani R., Anderson D.B., Zucchini S., Manservigi R. and Glorioso J.C., 1998. Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J. Virol.* **72**:6119-6130.
- Laquerre S., Person S. and Glorioso J.C., 1996. Glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 oligomerizes through the intermolecular interaction of a 28-amino-acid-domain. *J. Virol.* **70**:1640-1650.
- Lehman I.R. and Boehmer P.E., 1999. Replication of Herpes Simplex Virus DNA. *J. Biological Chemistry* Vol **274**, No. 40 28059-28062.
- Lehner P.J., Karttunen J.T., Wilkinson G.W. and Cresswell P., 1997. The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6904-6909.

- Leonard G.T. and Sen G.C., 1997. Restoration of interferon responses of adenovirus E1A-expressing HT1080 cell lines by overexpression of p48 protein. *J. Virol.* **71**:5095-5101.
- Leopardi R., van Sant C. and Roizman B., 1997. The herpes simplex virus 1 protein kinase US3 is required for protection from apoptosis induced by the virus. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **94**:7891-7896.
- Levine M., Goldin A.L. and Glorioso J.C., 1980. Persistence of herpes simplex virus genes in cells of neuronal origin. *J. Virol.* **35**:203.
- Lewandowski G.A., Lo D. and Bloom F.E., 1993. Interference with major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation in the brain by herpes simplex virus type 1: a possible mechanism of evasion of the immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2005-9.
- Ligas M.W. and Johnson D.C., 1988. A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by β -galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J. Virol.* **62**:1486-1494.
- Lindahl P., Gresser I., Leary P. and Tovey M., 1976. Interferon treatment of mice. Enhanced expression of histocompatibility antigens on lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:1284-1287.
- Lingen M., Hengerer F. and Falke D., 1997. Mixed vaginal infections of Balb/c mice with low virulent herpes simplex type 1 strains result in restoration of virulence properties: vaginitis/vulvitis and neuroinvasiveness. *Med. Microbiol. Immunol.* **185**: 217-22.
- Lio D., Caccamo N., D'Anna C., Cigna D., Candore G. and Caruso C., 1994. Viral Antibody Titers Are Influenced by HLA-DR2 Phenotype. *Exp. Clin. Immunogenet.* **11**:182-186.
- Lipp J. And Dobberstein B., 1986. Signal recognition particle-dependent membrane insertion of mouse invariant chain: a membrane-spanning protein with a cytoplasmically exposed amino terminus. *J. Cell Biol.* **102**:2169-2175.
- Litwin V., Jackson W. and Grose C., 1992. Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI. *J. Virol.* **66**:3643-3651.
- Liu T., Khanna K.M., Chen X., Fink D.J. and Hendricks R.L., 2000. CD8+ T cells can block herpes simplex virus type 1 (HSV-1) reactivation from latency in sensory neurons. *J. Exp. Med.* **191**:1459-1466.
- Liu Y., de Waal Malefyt R., Briere F., Parham C., Bridon J.M., Banchereau J., Moore K.W. and Xu J., 1997. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J. Immunol.* **158**: 604-613.
- Long E.O., LaVaute T., Pinet V. and Jaraquemanda D., 1994. Invariant chain prevents the HLA-DR restricted presentation of a cytosolic peptide. *J. Immunol.* 1487-1494.
- Loparev V.N., Parsons J.M., Knight J.C., Panus J.F., Ray C.A., Buller R.M., Pickup D.J. and Esposito J.J., 0,1998. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **95**:3786-91.
- Lopez, 1975. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. *Nature* **258**:152-153.
- Lorenzo M.E., Ploegh H.L. and Tirabassi R.S., 2001. Viral immune evasion strategies and the underlying cell biology. *Immunology* **13**:1-9.
- Lotteau V., Teyton L., Peleraux A., Nilsson T., Karlsson L., Schmid S.L., Quaranta V. and Peterson P.A., 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**:600-605.
- Lubinski J., Nagashunmugam T. and Friedman H.M., 1998. Viral interference with antibody and complement. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **9**:329-337.

- Lubinski J., Wang L., Mastellos D., Sahu A., Lambris J.D. and Friedman H.M., 1999. *In vivo* role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *J. Exp. Med.* **190**:1637-1646.
- MacCormac L.P. and Grundy J.E., 1996. Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J. Infect. Dis.* **174**:1151-1161.
- Machamer C.E. and Cresswell P., 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J. Immunol.* **129**:2564-2569.
- Mahr J.A. and Gooding L.R., 1999. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol. Rev.* **168**:121-130.
- Maloy K.J., Odermatt B., Hengartner H. and Zinkernagel R.M., 1998. Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:1160-1165.
- Manickan E., Rouse, R.J.D., Yu Z. Wire, W.S. and Rouse, B.T., 1995. Genetic Immunization against Herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **155**:259-265.
- Maric M.A., Taylor M.D. and Blum J.S., 1994. Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2171-2175.
- Marin W.D., Hicks G.G., Mendiratta S.K., Leva H.I., Ruley H.E. and Vancaer L., 1996. H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection. *Cell* **84**:543-550.
- Marks M.S., Blum J.S. and Cresswell P., 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol.* **111**:839-855.
- Marshall K.W., Liu A.F., Canales J., Perahia B., Jorgensen B., Gantzios R.D., Aguilar B., Devaux B. and Rothbard J.B., 1994. Role of the polymorphic residues in HLA-DR molecules in allele-specific binding of peptide ligands. *J. Immunol.* **152**:4946-4957.
- Martin S., Courtney R.J., Fowler G. and Rouse B.T., 1988. Herpes simplex virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes recognize virus nonstructural proteins. *J. Virol.* **62**:2265-2273.
- Matloubian M., Concepcion R.J. and Ahmed R., 1994. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J. Virol.* **68**:8056-8063.
- McGeoch D.J., Dalrymple M.A., Davison A.J., Dolan A., Frame M.C., McNab D., Perry L.J., Scott J.E. and Taylor P., 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**:1531-1574.
- McMichael A.J. and Phillips R.E., 1997. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:271-296.
- McNearny T.A., Odell C., Holers V.M., Spear P.G. and Atkinson J.P., 1987. Herpes simplex virus glycoproteins gC-1 and gC-2 bind to the third component of complement and provide protection against complement-mediated neutralization of viral infectivity. *J. Exp. Med.* **166**:1525-35.
- Mellins E., Cameron P., Amaya M., Goodman S., Pious D., Smith L. and Arp B., 1994. A mutant human histocompatibility leukocyte antigen DR molecule associated with invariant chain peptides. *J. Exp. Med.* **179**:541-549.
- Mendelsohn C.L., Wimmer E. and Racaniello V.R., 1989. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56**:855-865.

- Mester J.C., Highlander S.L., Osmand A.P., Glorioso J.C. and Rouse B.T., 1990. Herpes simplex virus type 1-specific immunity induced by peptides corresponding to an antigenic site of glycoprotein B. *J. Virol.* **64**: 5277-83.
- Mietz J.A., Unger T., Huibregtse J.M. and Howley P.M., 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* **11**:5013-5020.
- Mikloska Z. and Cunningham A.L., 1998. Herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gC and gD are major targets for CD4 T-lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J. Gen. Virol.* **79**:353-361.
- Mikloska Z., Kesson A.M., Penfold M.E. and Cunningham A.L., 1996. Herpes simplex virus protein targets for CD4 and CD8 lymphocyte cytotoxicity in cultured epidermal keratinocytes treated with interferon-gamma. *J. Infect. Dis.* **173**:7-17.
- Miller D.M., Rahill B.M., Boss J.M., Lairmore M.D., Durbin J.E., Waldman J.W. and Sedmak D.D., 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J. Exp. Med.* **187**:675-683.
- Miller D.M., Zhang Y., Rahill B.M., Waldman W.J. and Sedmak D.D., 1999. Human cytomegalovirus inhibits IFN- α -stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN- α signal transduction. *J. Immunol.* **162**:6107-6113.
- Miller J. and Germain R.N., 1986. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J. Exp. Med.* **164**:1478-1489.
- Miller L.K., 1997. Baculovirus interaction with host apoptotic pathways. *J. Cell. Physiol.* **173**:178-182.
- Miyazaki T., Wolf P., Tourne S., Waltzinger C., Dierich A., Barois N., Ploegh H., Benoist C. and Mathis D., 1996. Mice lacking H2-M complexes, enigmatic elements of the MHC class II peptide-loading pathway. *Cell* **84**:531-541.
- Mold C., Bradt B.M., Nemerow G.R. and Cooper N.R., 1988. Epstein-Barr virus regulates activation and processing of the third component of complement. *J. Exp. Med.* **168**:949-969.
- Momburg F., Fuchs S., Drexler J., Busch R., Post M., Hämmerling G.J. and Adorini L., 1993. Epitope-specific enhancement of antigen presentation by invariant chain. *J. Exp. Med.* **178**:1453-1458.
- Momburg F., Koch N., Möller P., Moldenhauer G., Butcher G.W. and Hämmerling G.J., 1986. Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after *in vivo* treatment with IFN- γ . *J. Immunol.* **136**:940-948.
- Montgomery R.I., Warner M.S., Lum B.J. and Spear P.G., 1996. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87**:427-436.
- Moore M., Horikoshi N. and Shenk T., 1996. Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **93**:11295-301.
- Moretta A. and Moretta L., 1997. HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:694-701.
- Mukherjee P., Dani A., Bhatia S., Singh N., Rudensky A.Y., George A., Bal V., Mayor S. and Rath S., 2001. Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J. Immunology* **167**:2632-2641.
- Nadimi F., Moreno J., Momburg F., Heuser A., Fuchs S., Adorini L. and Hämmerling G., 1991. Antigen presentation of the hen egg-white lysozyme but not of ribonuclease A is augmented by the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain. *Eur. J. Immunol.* **21**:1255-1263.

- Nash A.A., 2000. T cells and the Regulation of Herpes Simplex Virus Latency and Reactivation. *J. Exp. Med.* **191**:1455-1457.
- Navarro D., Paz P. and Pereira L., 1992. Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* **186**:99-112.
- Neefjes J.J., Momburg F. and Hämmerling G.J., 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* **261**:769-771.
- Newcomb J.R. and Cresswell P., 1993. Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated *in vivo*. *J. Immunol.* **151**:4153-4163.
- Nijenhuis M., Calafat J., Kuijpers K.G., Janssen H., de Haas M., Nordeng T.W., Bakke O. and Neefjes J.J., 1994. Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur. J. Immunol.* **24**:873-883.
- O'Donnell C.A. and Chan W.L., 1991. A comparison of T cell responses to glycoprotein B (gB-1) of herpes simplex virus type 1 and its non-glycosylated precursor protein, pgB-1. *Clin. exp. Immunol.* **86**:30-36.
- O'Sullivan D.M., Noonan D. and Quaranta V., 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternative initiation of transcription/translation. *J. Exp. Med.* **166**:444-460.
- Oh S.H., Bandyopadhyay S., Miller D.S. and Starr S.E., 1987. Cooperation between CD16(Leu-11b)⁺ NK cells HLA-DR⁺ cells in natural killing of herpesvirus-infected fibroblasts. *J. Immunol.* **139**: 2799-802.
- Oi V.T., Jones P.P. and Goding J.W. and Herzenberg L.A., 1987. *Curr. Top. Microbiology* **81**:115.
- Oldstone M.B., 1996. Virus-lymphoid cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12756-12758.
- Openshaw H., McNeill J.I., Lin X.H., Niland J. and Cantin E.M., 1995. Herpes simplex virus DNA in normal corneas: persistence without viral shedding from ganglia. *J. Med. Virol.* **46**:75.
- Ortmann B., Copeman J., Lehner P.J., Sadasivan B., Herberg J.A., Grandea A.G., Riddell S.R., Tampe R., Spies T., Trowsdale J. and Cresswell P., 1997. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* **277**:1306-9.
- Para M.F., Parish M.L. and Noble A.G., 1985. Potent neutralizing activity associated with anti-glycoprotein D specificity among monoclonal antibodies selected for binding to herpes simplex virions. *J. Virol.* **55**:483-488.
- Parham P., 1997. NK cells, MHC class I antigens and missing self. *Immunol. Rev.* **155**:1-221.
- Paulnock-King D., Sizer K.C., Freund Y.R., Jones P.P. and Parnes J.R., 1985. Coordinate induction of Ia α , β and Ii mRNA in a macrophage cell line. *J. Immunol.* **135**:632-636.
- Pellett P.E., Kousoulas K.G., Pereira L. and Roizman B., 1985. Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants. *J. Virol.* **53**:243-253.
- Peng T., Ponce-de-Leon M., Jiang H., et al., 1998. The gH-gL complex of herpes simplex virus (HSV) stimulates neutralizing antibody and protects mice against HSV type 1 challenge. *J. Virol.* **72**:65-72.
- Pereira L., 1994. Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infect. Agents and Disease*, Raven Press Ltd., New York, **3**:9-28.
- Pereira L., Ali M., Kousoulas K.G., Huo B. and Banks T., 1989. Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: neutralizing epitopes map in regions of continuous and discontinuous residues. *Virology* **172**:11-24.

- Pereira L., Klassen T. and Baringer J.R., 1980. Type-common and type-specific monoclonal antibody to herpes simplex virus type 1. *Infect. Immun.* **29**:724-732.
- Perelson A.S., Essunger P. and Ho D.D., 1997. Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS* **11**:S17-S24.
- Pertel P.E., Fridberg A., Parish M.L. and Spear P.G., 2001. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* **279**(1):313-24.
- Pesando J.M and Graf L., 1986. Differential expression of HLA-DR, -DQ, and -DP antigens on malignant B cells. *J. Immunol.* **136**:4311.
- Pessara U. and Koch N., 1990. Tumor necrosis factor α regulates expression of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by binding of an NF- κ B-like factor to a promotor element. *Mol. Cell Biol.* **10**:4146-4154.
- Pessara U., Momburg F. and Koch N., 1988. Cooperative effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α on the induction of the class II antigen-associated invariant chain expression. *Eur. J. Immunol.* **18**:1719-1726.
- Peters P.J., Neefjes J.J., Oorschot V., Ploegh H.L. and Geuze H.J., 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**:669-676.
- Peterson M. and Miller J., 1990. Invariant chain influences the immunological recognition of MHC class II molecules. *Nature* **345**:172-174.
- Peterson M. and Miller J., 1992. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41. *Nature* **357**:596-598.
- Piguet V., Schwartz O., Le Gall S. and Trono D., 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* **168**:51-63.
- Ploegh H.L., Orr H.T. and Strominger J.L., 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, -B, -C) and murine (H-2K, H-2D) class I molecules. *Cell* **24**:287-299.
- Preston C.M., 2000. Repression of viral transcription during herpes simplex virus latency. *J. Gen. Virol.* **81**:1-19.
- Qadri I., Gimeno C. and Pereira L., 1991. Mutations in conformation-dependent domains of herpes simplex virus 1 glycoprotein B affect the antigenic properties, dimerization, and transport of the molecule. *Virology* **180**:135-152.
- Raftery M., Muller A. and Schönrich G., 2000. Herpesvirus homologues of cellular genes. *Virus genes* **21**:65.
- Raftery M.J., Behrens C.K., Müller A., Krammer P.H., Walczak H. and Schönrich G., 1999. Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J. Exp. Med.* **190**:1103-1113.
- Rajcani J., Vojvodova A., Matis J., Kudelova M. et al., 1996. The syn³ strain HSZP of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) is not pathogenic for mice and shows limited neural spread. *Virus Res.* **43**: 33-44.
- Riberdy J.M., Newcomb J.R., Surman M.J., Barbosa J.A. and Cresswell P., 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* **360**:474-477.
- Roche P.A. and Cresswell P., 1990. Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* **345**:615-618.

- Roche P.A. and Cresswell P., 1991. Proteolysis of the class II-associated invariant chain generates a peptide binding site in intracellular HLA-DR molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3150-3154.
- Roche P.A., Marks M.S. and Cresswell P., 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**:392-394.
- Roche P.A., Teletski C.L., Karp D.R., Pinet V., Bakke O. and Long E.O., 1992. Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J.* **11**:2841-2847.
- Rodger G., Boname J., Bell S. and Minson T., 2001. Assembly and Organization of Glycoproteins B, C, D, and H in Herpes Simplex Virus Type 1 Particles Lacking Individual Glycoproteins: No Evidence for the Formation of a Complex of These Molecules. *J. Virol.* **75**:710-716.
- Romagnoli P. and Germain R.N., 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport and peptide occupancy. *J. Exp. Med.* **180**:1107-1113.
- Romagnoli P. and Germain R.N., 1995. Inhibition of invariant chain (Ii)-calnexin interaction results in enhanced degradation of Ii but does not prevent the assembly of alpha beta Ii complexes. *J. Exp. Med.* **182**(6):2027-36.
- Roop C., Hutchinson L. and Johnson D.C., 1993. A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J. Virol.* **67**:2285-2297.
- Rosenberg E.S., Billingsley J.M., Caliendo A.M. et al., 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**:1447-1450.
- Rudensky A.Y., Preston-Hurlburt P., Hong S.-C., Barlow A. and Janeway C.A. Jr, 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* **353**:622.
- Saha K. and Wong P.K., 1992. Protective role of cytotoxic lymphocytes against murine leukemia virus-induced neurologic disease and immunodeficiency is enhanced by the presence of helper T cells. *Virology* **188**:921-925.
- Salio M., Cella M., Suter M. and Lanzavecchia A., 1999. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur. J. Immunol.* **29**:3245-3253.
- Sanchez-Pescador L., Paz P., Navarro D., Pereira L. and Kohl S., 1992. Epitopes of Herpes simplex virus type 1 glycoprotein B that bind type-common neutralizing antibodies elicit type-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Inf. Dis.* **166**:623-7.
- Sanchez-Pescador L., Pereira L., Charlebois E.D. and Kohl S., 1993. Antibodies to epitopes of Herpes simplex virus type I glycoprotein B (gB) in human sera: analysis of functional gB epitopes defined by inhibition of murine monoclonal antibodies. *J. Inf. Dis.* **168**:844-53.
- Sanderson F., Thomas C., Neefjes J. and Trowsdale J., 1996. Association between HLA-DM and HLA-DR in vivo. *Immunity* **4**:87-96.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.
- Santoli D., Trinchieri G. and Koprowski H., 1978. Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J. Immunol.* **121**:532-538.
- Schaff W.T., Hruska K.A., McCourt D.W., Green M. and Schwartz B.D., 1992. HLA-DR associates with specific stress proteins and is retained in the endoplasmic reticulum in invariant chain negative cells. *J. Exp. Med.* **176**:657-666.
- Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D. and Howley P.M., 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* **75**:495-505.

- Schenck K., 1991. Herstellung und immunchemische Charakterisierung rekombinanter Deletionsmutanten der MHC-Klasse II-assoziierenden Invarianten Kette. Dissertation, Bonn.
- Schmid D.S., 1988. The human MHC-restricted cellular response to herpes simplex virus type 1 is mediated by CD4⁺, CD8⁻ T cells and is restricted to the DR region of the MHC complex. *J. Immunol.* **140**:3610.
- Schust D.J., Hill A.B. and Ploegh H.L., 1996. Herpes simplex virus blocks intracellular transport of HLA-G in placentally derived human cells. *J. Immunol.* **157**:3375-80.
- Sebzda E., Choi M., Fung-Leung W.P., Mak T.W. and Ohashi P.S., 1997. Peptide-induced positive selection of TCR transgenic thymocytes in a coreceptor-independent manner. *Immunity* **6**:643-653.
- Sekaly J.P., Jacobsen S., Richert J.R., Tonnelle C., McFarland H.F. and Long E.O., 1988. Antigen presentation to HLA class II-restricted measles virus-specific T cell clones can occur in the absence of the invariant chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:1209-1212.
- Sette A., Ceman S., Kubo R.T., Sakaguchi K., Appella E., Hunt D.F., Davis T.A., Michel H., Shabanowitz J., Rudersdorf R., Grey H.M., DeMars R., 1992. Invariant chain peptides in most HLA-DR molecules of an antigen-processing mutant. *Science* **258**:1801-1804.
- Sharp P.M., 2002. Origins of Human Virus Diversity. *Cell* **108**:305-312.
- Sheperd J.C., Schumacher T.N.M., Ashton-Rickardt P.G., Imaeda S., Ploegh H.L., Janeway C.A. Jr. and Tonegawa S., 1993. TAP1-dependent peptide translocation *in vitro* is ATP dependent and peptide selective. *Cell* **74**:577-584.
- Sherman M.A., Weber D.A. and Jensen P.E., 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* **3**:197.
- Shimeld C., Easty D.L. and Hill T.J., 1999. Reactivation of herpes simplex virus type 1 in the mouse trigeminal ganglion: an in vivo study of virus antigen and cytokines. *J. Virol.* **73**:1767-1773.
- Shimeld C., Whiteland J.L., Nicholls S.M., Grinfeld E., Easty D.L. Gao H. and Hill T.J., 1995. Immune cell infiltration and persistence in the mouse trigeminal ganglion after infection of the cornea with herpes simplex virus type 1. *J. Neuroimmunol.* **61**:7-16.
- Shisler J., Yang C., Walter B., Ware C.F. and Gooding L.R., 1997. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. *J. Virol.* **71**:8299-8306.
- Shukla D., Liu J., Blaiklock P., et al., 1999. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99**:13-22.
- Siebenkotten I.M., Carstens C. and Koch N., 1998. Identification of a Sequence That Mediates Promiscuous Binding of Invariant Chain to MHC Class II Allotypes. *J. Immunology* **160**:3355-3362.
- Simmons A. and Tscharke D.C., 1992. Anti-CD8 impairs clearance of herpes simplex virus from the nervous system: implications for the fate of virally infected neurons. *J. Exp. Med.* **175**:1337-1344.
- Simmons A. und Nash A.A., 1985. Role of antibody in primary and recurrent herpes simplex virus infection. *J. Virol.* **53**:944-948.
- Simonis S. and Cullen S.E., 1986. Fatty acylation of murine Ia α , β , and invariant chains. *J. Immunol.* **136**:2962-2967.
- Simonsen A., Momburg F., Drexler J., Hämmerling G.J. and Bakke O., 1993. Intracellular distribution of the MHC class II molecules and the associated invariant chain (Ii) in different cell lines. *Int. Immunol.* **5**:903-917.

- Singer P.A., Lauer W., Dembic Z., Mayer W.E., Lipp J., Koch N., Hämmerling G., Klein J. and Dobberstein B., 1984. Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J.* **3**:873-877.
- Sivadon V., Lebon P. and Rozenberg F., 1998. Variations of HSV-1 glycoprotein B in human herpes simplex encephalitis. *J. Neurovirology* **4**: 106-14.
- Sloan V.S., Cameron P., Porter G., Gammon M., Amaya A., Mellins E. and Zaller D.M., 1995. Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* **375**:802.
- Smith C.A., Hu F.Q., Smith T.D., Richards C.L., Smolak P., Goodwin R.G. and Pickup D.J., 1996. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT alpha. *Virology* **223**:132-147.
- Spear P.G., Shieh M.T., Herold B.C. et al., 1992. Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **313**:341-353.
- Spriggs M. K., Armitage R.J., Comeau, M.R. Strockbine L. et al., 1996. The extracellular domain of the Epstein-Barr virus BZLF2 protein binds to HLA-DR β chain and inhibits antigen presentation. *J. Virol.* **70**: 5557-63.
- Stockinger B., Pessara U., Lin R.H., Habicht J., Grez M. and Koch N., 1989. A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* **56**:683-689.
- Strubin M., Berte C. and Mach B., 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia-antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* **5**:3483-3488.
- Stumptner P. and Benaroch P., 1997. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J.* **16**(19):5807-18.
- Subak-Sharpe J.H. and Dargan D.J., 1998. HSV Molecular Biology: General Aspects of Herpes Simplex Virus Molecular Biology. *Virus Genes* **16**:3, 239-51.
- Sung E. and Jones P.P., 1981. The invariant chain of murine Ia antigens: its glycosylation, abundance and subcellular localization. *Mol. Immunol.* **18**:899-913.
- Tang S., Scheiffarth O.F. and Stefani F.H., 1993. Clinical and immunohistochemical correlation of herpetic keratitis with the expression of HLA-DR antigen. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **231**: 162-5.
- Tanigawa M., Bigger J.E., Kanter M.Y. and Atherton S.S., 2000. Natural killer cells prevent direct anterior-to-posterior spread of herpes simplex virus type 1 in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**:132-137.
- Teyton L., O'Sullivan D.M., Dickson P.W., Lotteau V., Sette A., Fink P. and Peterson P.A., 1990. Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature* **348**:39-44.
- Thayer W.P., Ignatowicz L., Weber D.A. and Jensen P.E., 1999. Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J. Immunol.* **162**:1502-1509.
- Tollefson A.E., 1998. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. *Nature* **392**:726-730.
- Tomazin R., Boname J., Hegde N.R., Lewinsohn D.M., Altschuler Y., Jones T.R., Cresswell P., Nelson J.A., Riddell S.R. and Johnson D.C., 1999. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4⁺ T cells. *Nat. Med.* **5**:1039-1043.
- Torpey D.J., Lindsley M.D and Rinaldo C.R., 1989. HLA restricted lysis of herpes simplex virus infected monocytes and macrophages mediated by CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.* **142**:1325.

- Tortorella D., Gewurz B.E., Furman M.H., Schust D.J. and Ploegh H.L., 2000. Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:861-926.
- Trinchieri G., 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**:187-376.
- Turner A., Bruun B., Minson T. et al., 1998. Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J. Virol.* **72**:873-875.
- Unanue E.R. and Allen P.M., 1987. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* **236**:551-557.
- van Ham S.M., Grüneberg U., Malcharek G., Bröker I., Melms A. and Trowsdale J., 1996. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DM edits peptides presented by HLA-DR according to their ligand binding motifs. *J. Exp. Med.* **184**:2019-2024.
- van Vliet K.E., De Graaf-Miltenburg L.A., Verhoef J. and van Strijp J.A., 1992. Direct evidence for antibody bipolar bridging on herpes simplex virus-infected cells. *Immunology* **77**:109-115.
- Velcek J. and Sen G.C., 1996. Interferons and other cytokines. *Fundamental Virology* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers: 341-365.
- Viola A and Lanzavecchia A., 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* **273**:104-106.
- Viville S., Neeffes J., Lotteau V., Dierich A., Lemeur M., Ploegh H., Benoist C. and Mathis D., 1993. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**:635-648.
- Wallace M.E., Keating R., Heath W.R. and Carbone F.R., 1999. The cytotoxic T-cell response to herpes simplex virus type 1 infection of C57BL/6 mice is almost entirely directed against a single immunodominant determinant. *J. Virol.* **73**:7619-7626.
- Wasik T.J., Jagodzinski P.P., Hyjek E.M. et al., 1997. Diminished HIV-specific CTL activity is associated with lower type 1 and enhanced type 2 responses to HIV-specific peptides during perinatal HIV infection. *J. Immunol.* **158**:6029-6036.
- Watanabe M., Suzuki T., Taniguchi M. and Shinohara N., 1983. Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies cross-reactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation* **36**:712-718.
- Weber D.A., Evavold B.D. and Jensen P.E., 1996. Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* **274**:618-620.
- Whitney R.J., 1990. Herpes Simplex Virus. *Virology* 2nd ed., edited by Fields N., Knipe D.M. et al., Raven Press Ltd. New York **Vol.2**:1843-1888.
- Wiertz E.J., Jones T.R., Sun L., Bogoy M., Geuze H.J. and Ploegh H.L., 1996b. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**:769-779.
- Wiertz E.J., Tortorella D., Bogoy M., Yu J., Mothes W., Jones T.R., Rapoport T.A. and Ploegh H.L., 1996a. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**:432-438.
- Williams D.B. and Watts T.H., 1995. Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:77-84.
- Witmer L.A., Rosenthal K.L., Graham F.L., Friedman H.M., Yee A. and Johnson D.C., 1990. Cytotoxic T lymphocytes specific for herpes simplex virus (HSV) studied using adenovirus vectors expressing HSV glycoproteins. *J. Gen. Virol.* **71**:387-396.

- Wittels M. and Spear P.G., 1991. Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* **18**:271-290.
- WuDunn D. and Spear P.G., 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* **63**:52-58.
- Yamashita Y., Yamada M., Daikoku T., Yamada H., Tadauchi A., Tsurumi T. and Nishiyama Y., 1996. Calnexin associates with the precursors of glycoproteins B, C, and D of herpes simplex virus type 1. *Virology* **225**:216-222.
- Yasukawa M., Inatsuki A. and Kobayashi Y., 1989. Differential *in vitro* activation of CD4⁺CD8⁻ and CD8⁺CD4⁻ herpes simplex virus-specific cytotoxic cells. *J. Immunol.* **143**:2051.
- Yew P.R. and Berk A.J., 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature* **357**:82-85.
- Yewdell J.W. and Bennink J.R., 1990. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* **62**:203-206.
- Young E. and Pepose J.S., 1987. Class II induction of human corneal fibroblasts by cell-free supernatants from HSV-stimulated lymphocytes. *Curr. Eye Res.* **6**: 141-4.
- Zhong G., Castellino F., Romagnoli P. and Germain R.N., 1996. Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J. Exp. Med.* **184**(5):2061-6.
- Zhu L. and Jones P.P., 1990. Transcriptional control of the invariant chain gene involves promotor and enhancer elements common to and distinct from major histocompatibility complex class II genes. *Mol. Cell Biol.* **10**:3906-3916.
- Zinkernagel R.M. and Doherty P.C., 1974. Restriction of *in vitro* T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**:701-702.
- Zinkernagel R.M., Bachmann M.F., Kundig T.M., Oehen S., Pircher H. and Hengartner H., 1996. On immunological memory. *Annu. Rev. Immunol.* **14**:333-367.

7. Anhang

Sequenzvergleich von Glykoprotein B in verschiedenen HSV-1 Stämmen

	10	20	30	40	50	60		
gB-ANGpath	:	MRQGAPARGRRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTG	:	65				
gBstrain17	:	MRQGAPARGRRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTG	:	65				
gB-KOS	:	MHQGAPSWGRRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPLGAAPTG	:	65				
gB-Patton	:	MRQGAPARGCRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPLGAAPTG	:	65				
gB-Miyama	:	MRQGAPARGCRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTG	:	65				
gB-strainF	:	MRQGA-ARGCRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTG	:	64				
gB-HSZP	:	MRQGAPARGCRWFVVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPLGAAPTG	:	65				
		MrQGAParG		RWFVVWALLGLTLGVLVASAAP3		SPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPa		G PTG
	70	80	90	100	110	120	130	
gB-ANGpath	:	DPKPKKNKKPKPKPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
gBstrain17	:	DPKPKKNRKPKPKPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
gB-KOS	:	DPKPKKNKKPKNETPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
gB-Patton	:	DPKPKKNKKPKNETPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
gB-Miyama	:	DTKPKKNKKPKNETPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
gB-strainF	:	DTKPKKNKKPKNETPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	129				
gB-HSZP	:	DPKPKKNKKPKNETPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQP	:	130				
		D KPKKN4KPK P		PPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAent		DANFYVCPPTGATVVQFEQP		
	140	150	160	170	180	190		
gB-ANGpath	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
gBstrain17	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
gB-KOS	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
gB-Patton	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
gB-Miyama	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
gB-strainF	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	194				
gB-HSZP	:	RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE	:	195				
		RRCPTRPEGQNYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFE						
	200	210	220	230	240	250	260	
gB-ANGpath	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
gBstrain17	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
gB-KOS	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
gB-Patton	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
gB-Miyama	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
gB-strainF	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	259				
gB-HSZP	:	EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE	:	260				
		EVIDKINAKGVCIRSTAKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVE						
	270	280	290	300	310	320		
gB-ANGpath	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	325				
gBstrain17	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	325				
gB-KOS	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTTYAADRFKQVDGF	:	325				
gB-Patton	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	325				
gB-Miyama	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	325				
gB-strainF	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	324				
gB-HSZP	:	AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPYDEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHTSYAADRFKQVDGF	:	325				
		AFHRYGTTVNCIVEVDARSVYPY1EFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHEHT3YAADRFKQVDGF						
	330	340	350	360	370	380	390	
gB-ANGpath	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
gBstrain17	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
gB-KOS	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
gB-Patton	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
gB-Miyama	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
gB-strainF	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	389				
gB-HSZP	:	YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA	:	390				
		YARDLTTKARATAPTRNLLTTPKFTVAWDVWPKRPSVCTMTKWQEVDEMLRSEYGGSRFRSSDA						
	400	410	420	430	440	450		
gB-ANGpath	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
gBstrain17	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
gB-KOS	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
gB-Patton	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
gB-Miyama	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
gB-strainF	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	454				
gB-HSZP	:	ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL	:	455				
		ISTFTTNLTLEYPLSRVDLGDICGKDARDAMDRI FARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPL						

	460	470	480	490	500	510	520	
gB-ANGpath :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	
gBstrain17 :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	
gB-KOS :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	
gB-Patton :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	
gB-Miyama :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	
gB-strainF :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 519	
gB-HSZP :	LSNTLAELYVREHLREQSRKPPNPPTPPPPGASANASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDM						: 520	

	530	540	550	560	570	580	
gB-ANGpath :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585
gBstrain17 :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585
gB-KOS :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585
gB-Patton :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585
gB-Miyama :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585
gB-strainF :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 584
gB-HSZP :	LGRVAIAWCELQNHETLWNEARKLNPNAIASATVGRRVVSARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQN						: 585

	590	600	610	620	630	640	650	
gB-ANGpath :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	
gBstrain17 :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	
gB-KOS :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	
gB-Patton :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	
gB-Miyama :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	
gB-strainF :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 649	
gB-HSZP :	SMRISSRPGACYSRPLVSFRYEDQGPLVEGQLGENNELRLTRDAIEPCTVGHRRYFTFGGGYVYF						: 650	

	660	670	680	690	700	710	
gB-ANGpath :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715
gBstrain17 :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715
gB-KOS :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715
gB-Patton :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715
gB-Miyama :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715
gB-strainF :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 714
gB-HSZP :	EEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDEHFVPLEVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLR						: 715

	720	730	740	750	760	770	780	
gB-ANGpath :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	
gBstrain17 :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	
gB-KOS :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	
gB-Patton :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	
gB-Miyama :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	
gB-strainF :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 779	
gB-HSZP :	FADIDTVIHADANAAMFAGLGAFFEGMGDLGRAVGKVVVGIVGGVVSASVSGVSSFMSNPFALAV						: 780	

	790	800	810	820	830	840	
gB-ANGpath :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845
gBstrain17 :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845
gB-KOS :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845
gB-Patton :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845
gB-Miyama :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845
gB-strainF :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 844
gB-HSZP :	GLLVLAGLAAAFFAFRYVMRLQSNPMKALYPLTTKELKNPTNPDASGEEGEGGDFDEAKLAEARE						: 845

	850	860	870	880	890	900	
gB-ANGpath :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904
gBstrain17 :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904
gB-KOS :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904
gB-Patton :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904
gB-Miyama :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904
gB-strainF :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 903
gB-HSZP :	MIRYMALVSAMERTTEHKAKKKGTSALLSAKVTDMMVRKRRNTNYTQVPNKDGDADDDDL						: 904

Proteinsequenzen der rekombinanten und chimären Ii-Proteine

	1	10	20	30	40	50	60	70
Ii31								
Ii Δ81-127	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii Δ90-127	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii Δ90-127 (K82A)	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii Δ90-127 (P86A)	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii Δ90-127 (K82L/K85L)	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii Δ90-127 (P81L/P86L)	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii/gB	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii/gBmut	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
Ii/gB _{NT}	MDDQ	RDLI	SNHE	QLPI	LGNR	PREPER	CSRG	ALYT
		80	90	100	110	120	130	140
Ii31								
Ii Δ81-127	LQLE	SLRM	KLPS	AKPV	SQMR	MATPLL	MRPMS	MDNML
Ii Δ90-127	LQLE	SLRM	KLPS	AKPV	SQKL	-----	LLTR	SGPLE
Ii Δ90-127 (K82A)	LQLE	SLRM	KLP	ASAK	PVSQ	KL-----	LLTR	SGPLE
Ii Δ90-127 (P86A)	LQLE	SLRM	KLP	PKSA	KAVS	QKL-----	LLTR	SGPLE
Ii Δ90-127 (K82L/K85L)	LQLE	SLRM	KLP	LSAL	PVSQ	KL-----	LLTR	SGPLE
Ii Δ90-127 (P81L/P86L)	LQLE	SLRM	KLL	KSAL	LVSQ	KL-----	LLTR	SGPLE
Ii/gB	LQLE	SLRM	KLP	KPPK	PPRP	PAGDN	NATVA	AAKL
Ii/gBmut	LQLE	SLRM	KLP	LPPL	PPRP	PAGDN	NATVA	AAKL
Ii/gB _{NT}	LQLE	SLRM	KLP	KNPT	PPRP	PAGDN	NATVA	AAKL

Proteinsequenzen der rekombinanten und chimären Ii-Proteine

	150	160	170	180	190	200	210
Ii31							
Ii Δ81-127	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii Δ90-127	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii Δ90-127 (K82A)	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii Δ90-127 (P86A)	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii Δ90-127 (K82L/K85L)	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii Δ90-127 (P81L/P86L)	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii/gB	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii/gBmut	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						
Ii/gB _{NT}	KGTFPENLKHLKNSMDGVNWKIFESWMKQWLLFEMSKNSLEEKKPTEAPPKEPLDMEDLSSGLGVTRQEL						

	215
Ii31	
Ii Δ81-127	GQVTL
Ii Δ90-127	GQVTL
Ii Δ90-127 (K82A)	GQVTL
Ii Δ90-127 (P86A)	GQVTL
Ii Δ90-127 (K82L/K85L)	GQVTL
Ii Δ90-127 (P81L/P86L)	GQVTL
Ii/gB	GQVTL
Ii/gBmut	GQVTL
Ii/gB _{NT}	GQVTL

Proteinsequenzen der gB ANGpath-Mutanten

	1	10	20	30	40	50	60	70
gB ANGpath Δ 75-92	MRQGAPARGRRWFVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTGDPKPK							
gB ANGpath _{NT}	MRQGAPARGRRWFVWALLGLTLGVLVASAAPSSPGTPGVAAATQAANGGPATPAPPAPGAPPTGDPKPK							
		80	90	100	110	120	130	140
gB ANGpath Δ 75-92	KNKK-----GHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQPRRCPTRPEGQ							
gB ANGpath _{NT}	KNKKPK <u>NP</u> TPPRPAGDNATVAAGHATLREHLRDIKAENTDANFYVCPPTGATVVQFEQPRRCPTRPEGQ							
		150	160	170	180	190	200	210
gB ANGpath Δ 75-92	NYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRST							
gB ANGpath _{NT}	NYTEGIAVVFKENIAPYKFKATMYKDVTVSQVWFGHRYSQFMGIFEDRAPVPFEEVIDKINAKGVCRST							
		220	230	240	250	260	270	280
gB ANGpath Δ 75-92	AKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEVDARS							
gB ANGpath _{NT}	AKYVRNNLETTAFHRDDHETDMELKPANAATRTRSGWHTTDLKYNPSRVEAFHRYGTTVNCIVEEVDARS							
		290	300	310	320	330	340	350
gB ANGpath Δ 75-92	VYPYNEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHTTEHTSYAADRFKQVDGFYARDLTTKARATAPTTNRNLLTTPKF							
gB ANGpath _{NT}	VYPYNEFVLATGDFVYMSPFYGYREGSHTTEHTSYAADRFKQVDGFYARDLTTKARATAPTTNRNLLTTPKF							

Proteinsequenzen der gB ANGpath-Mutanten

	360	370	380	390	400	410	420
gB ANGpath Δ 75-92	TVAWDWVPKRPSVCTMTKWQ	EVDEMLRSEYGG	SFRFSSDAISTTFTTNL	TEYPLSRVDLGDCIGKDARDA			
gB ANGpath _{NT}	TVAWDWVPKRPSVCTMTKWQ	EVDEMLRSEYGG	SFRFSSDAISTTFTTNL	TEYPLSRVDLGDCIGKDARDA			
	430	440	450	460	470	480	490
gB ANGpath Δ 75-92	MDRIFARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPLLSNTLAELYVREHLREQSRKPPNP	TPPPPGASANA					
gB ANGpath _{NT}	MDRIFARRYNATHIKVGQPQYYLANGGFLIAYQPLLSNTLAELYVREHLREQSRKPPNP	TPPPPGASANA					
	500	510	520	530	540	550	560
gB ANGpath Δ 75-92	SVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDMLGRVAIAWCELQNH	ELTLWNEARKLNPNAIASATVGR	RVS				
gB ANGpath _{NT}	SVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQRHVNDMLGRVAIAWCELQNH	ELTLWNEARKLNPNAIASATVGR	RVS				
	570	580	590	600	610	620	630
gB ANGpath Δ 75-92	ARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQNSMRIS	SRPGACYSRPLVSFRYEDQG	PLVEGQLGENNELRLTRDAI				
gB ANGpath _{NT}	ARMLGDVMAVSTCVPVAADNVIVQNSMRIS	SRPGACYSRPLVSFRYEDQG	PLVEGQLGENNELRLTRDAI				
	640	650	660	670	680	690	700
gB ANGpath Δ 75-92	EPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSGLL						
gB ANGpath _{NT}	EPCTVGHRRYFTFGGGYVYFEEYAYSHQLSRADITTVSTFIDLNITMLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSGLL						

Proteinsequenzen der gB ANGpath-Mutanten

	710	720	730	740	750	760	770
gB ANGpath Δ 75-92	DYTEVQRRNQ	LHDLRFADID	TVIHADANAAM	FAGLGAF	FEGMGDLGRA	VGKVVMGIV	GGVVS
gB ANGpath _{NT}	DYTEVQRRNQ	LHDLRFADID	TVIHADANAAM	FAGLGAF	FEGMGDLGRA	VGKVVMGIV	GGVVS

	780	790	800	810	820	830	840
gB ANGpath Δ 75-92	MSNPFGALAV	GLLVLAGLAA	FFAFRYVMRL	QSNPMKALY	PLTTKELKN	PTNP	DASGE
gB ANGpath _{NT}	MSNPFGALAV	GLLVLAGLAA	FFAFRYVMRL	QSNPMKALY	PLTTKELKN	PTNP	DASGE

	850	860	870	880	890	900	904
gB ANGpath Δ 75-92	AEAREMIRYMA	LVSMERTEHK	KAKKKGTSAL	LSAKVTDMVM	RKRNTNYTQ	VPNKDGD	ADEDDL
gB ANGpath _{NT}	AEAREMIRYMA	LVSMERTEHK	KAKKKGTSAL	LSAKVTDMVM	RKRNTNYTQ	VPNKDGD	ADEDDL

Anmerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1997 bis Dezember 2001 unter Anleitung von Prof. Dr. Norbert Koch am Zoologischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Abteilung Immunbiologie angefertigt. Sie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (PN 7454/ Molekularer Mechanismus der Antigenprozessierung) und über den Sonderforschungsbereich 284 gefördert.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. N. Koch danke ich für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit an seinem Institut durchführen zu können, sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die mir gewährte Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. K.-H. Scheidtman danke ich für die Übernahme der Koreferenz der vorliegenden Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für ihre Hilfe und Unterstützung während meiner Arbeit und für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Angelika König, Johannes Winkler und Angelika Schneiders für ihre wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen bei der Erstellung dieser Arbeit. Johannes Winkler möchte ich im Besonderen für die computertechnische Unterstützung danken.

Frau Dr. A.M. Eis-Hübinger (Universitätsklinik Bonn) danke ich für die Bereitstellung von HSV-Material.

Frau Dr. S. Koch (Universitätsklinik Bonn) danke ich für die Messung der Proliferationsversuche.

Der Abteilung für Molekulare Genetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität danke ich für die Bereitstellung des Isotopen- und Photolabors.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit –einschließlich Tabellen und Abbildungen–, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie, abgesehen von der unten angegebenen zur Veröffentlichung eingereichten Teilpublikation, noch nicht vollständig veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.

Zur Veröffentlichung eingereichte Teilpublikation:

Sievers E., Neumann J., Raftery M., Schönrich G., Eis-Hübinger A.M. and Koch N., 2002. Glycoprotein B from Strain 17 of Herpes Simplex Virus Type 1 Contains an Invariant Chain Homologous Sequence That Binds to MHC Class II Molecules.